

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

“Influencia del arsénico y boro sobre la Fijación Biológica de Nitrógeno
entre *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa* (alfalfa) *in vitro*”

TESIS

Presentada por:

Bach. Carla del Pilar Calizaya Limaco

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 250

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIOLOGO – MICROBIOLOGO

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con Resolución de Facultad N° 8101 – 2015. FACI – UN/JBG ha designado como jurados para la sustentación de Tesis:

“Influencia del arsénico y boro sobre la Fijación Biológica de Nitrógeno entre *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa* (alfalfa) *in vitro*”; el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : Mgr. ROBERTO CASTELLANOS CABRERA

SECRETARIO : Dr. CÉSAR CEVALLOS COLUMBUS

VOCAL : Mgr. ISABEL ANCCO OLIVA

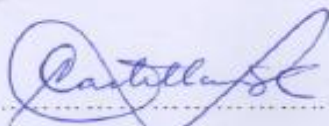
Para examinar y calificar el trabajo de Tesis sustentado en acto público el día 13 de mayo del 2015.

Presentado por la bachiller **CARLA DEL PILAR CALIZAYA LIMACO**, de la Escuela Académico Profesional de Biología – Microbiología.


El jurado calificador, en forma secreta e individual se pronunció sobre el calificativo del trabajo expuesto y procedió a emitir el siguiente resultado:

APROBADO por **UNANIMIDAD** con **3** votos a favor y promedio de **BUENO**.


Para ratificar lo detallado firman:



Presidente



Secretario



Vocal

DEDICATORIA

A mis abuelos, por todas las enseñanzas y el inmenso cariño transmitido en vida, que hoy me sirve de ejemplo de vida.

A mi familia, por todos los sabios consejos que se han convertido en mi guía.

A mis hermanos, Franco, Lucía, Francesca y María por ser mi motor y motivación para superarme cada día.

A mis amigos y amigas por darme el aliento para concluir este paso.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el inmenso amor, por no desistir en su objetivo de motivarme a seguir adelante.

A mi asesora Liduvina Sulca Q. por su ayuda incondicional, por todas las palabras de aliento y por la exigencia para cumplir este objetivo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
2. HIPÓTESIS	6
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVOS	7
4.1. Objetivo General.....	7
4.2. Objetivos Específicos.....	7
5. MARCO TEÓRICO.....	8
5.1. Metales pesados.....	8
5.2. Arsénico	10
5.3. Boro.....	14
5.4. Calidad de Agua de riego	16
5.5. <i>Medicago sativa</i>	19
5.6. Género <i>Sinorhizobium</i>	20
5.7. Fijación de Nitrógeno.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1. Material Biológico.....	28
6.1.1 Microorganismo y medios de cultivo.....	28
6.1.2 Material vegetal	29
6.2. Diseño Experimental.....	29
6.3. Metodología	31

6.3.1 Obtención de nódulos de <i>Medicago sativa</i>	31
6.3.2 Aislamiento de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	31
6.3.3 Pruebas de pureza.....	32
6.3.4 Caracterización fenotípica de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	33
6.3.5 Autenticación.....	33
6.3.6 Preparación de concentraciones de arsénico y boro	34
6.3.7 Evaluación de <i>Sinorhizobium meliloti</i> en diferentes concentraciones de arsénico y boro <i>in vitro</i>	36
6.3.8 Evaluación de las semillas de <i>Medicago sativa</i> en diferentes concentraciones de arsénico y boro <i>in vitro</i>	36
6.3.9 Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Aislamiento de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	41
7.2. Pruebas de Pureza	42
7.3. Caracterización fenotípica de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	43
7.4. Evaluación de <i>Sinorhizobium meliloti</i> en diferentes concentraciones de arsénico y boro <i>in vitro</i>	46
7.5. Evaluación de <i>Medicago sativa</i> en diferentes concentraciones de arsénico y boro <i>in vitro</i>	48
8. DISCUSIÓN.....	71
9. CONCLUSIONES.....	78
10. RECOMENDACIONES	80
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
12. ANEXOS.....	89

RESUMEN

Las leguminosas son importantes en los sistemas productivos debido a la capacidad de aportar nitrógeno atmosférico es de especial importancia porque produce el 50% de 175 millones de toneladas de fijación biológica de nitrógeno total en todo el mundo, asociación que contribuye entre 1/3 y un ½ del nitrógeno fijado de la atmósfera.

Para el presente trabajo se tuvo en cuenta la calidad del agua de riego usada para el cultivo de *Medicago sativa*, que según la normativa publicada por el diario El Peruano, los parámetros para aguas de riego de vegetales de tallo bajo y alto son: arsénico = 0.05 mg/L, para el caso del boro = 0.5 - 6 mg/L. Siendo los valores de arsénico y boro en el agua de riego actualmente usada en este cultivo de 0.5 mg/L y 7.8 mg/L respectivamente. Esta posible fuente de toxicidad de estos metales pesados sobre la simbiosis entre *Sinorhizobium* – leguminosa posiblemente influye en las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo, la fijación de nitrógeno y crecimiento de las leguminosas. Por lo que se plantea la hipótesis de que: Las concentraciones muy bajas o elevadas de arsénico y boro influirán en la FBN entre *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa in vitro*.

Para lo cual se evaluó la influencia de arsénico en 5 concentraciones (0.1 mg/L, 0.15 mg/L, 0.25 mg/L, 0.5 mg/L y 0,75 mg/L) y del boro en 4 concentraciones (5.8 mg/L, 6.8 mg/L, 7.8 mg/L y 8.8 mg/L) sobre el

crecimiento de 38 cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas a partir de nódulos de *Medicago sativa*, a través de la medición de la densidad óptica de su biomasa. Se evaluó la influencia de arsénico y boro sobre el crecimiento y desarrollo de las semillas de *Medicago sativa*, a través de los índices de crecimiento y germinación, velocidad de crecimiento y germinación, número de semillas emergida y número de semillas con emergencia completa e incompleta. Por lo evaluado se obtuvo que la fijación de nitrógeno podría ser afectado por el boro en todas las concentraciones probadas al aumentar el número de semillas no emergidas y no se vería afectado en concentraciones de arsénico que no superen los 0.15 mg/L de As.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Medicago sativa* (alfalfa) es un recurso fundamental para la producción agropecuaria en las regiones templadas del mundo, su calidad nutritiva, producción de forraje, crecimiento, perennidad, plasticidad y capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico, la convierten en una especie esencial para muchos sistemas de producción agropecuaria. (D'Attellis, 2005)

En Tacna, una de las zonas productoras de *Medicago sativa* es Ilabaya, provincia de Jorge Basadre Grohmann, cuya composición del agua del río es variable. Cuya cuenca esta formada por los ríos Callazas y Salado, que tienen importantes cantidades de contaminantes como sulfatos, arsénico y boro, llegando a valores de 0.85 mg/L de As y 4.2 mg/L de B. Así mismo el río Salado recibe el aporte de aguas hidrotermales de Calientes y aguas del río Jaruma, llegando a valores de 1.44 mg/L de As y 11.0 mg/L de B. (Municipalidad Provincial de Jorge Basadre Grohmann, 2008). Se han registrado trabajos de investigación sobre la simbiosis con respecto a la toxicidad de varios metales de distinto origen. Así se tiene estudios como el de Pajuelo y Col, que investigaron los efectos tóxicos del arsénico sobre la interacción simbiótica de *Sinorhizobium* – *Medicago sativa*, donde los resultados revelan que las bacterias fueron capaces de crecer a concentraciones tan altas como 10 mM de arsénico, sin embargo, a 25-35 mM de arsenito se produjo la senescencia temprana en los nódulos de las plantas crecidas en arsénico (Pajuelo, 2008). Por otro lado Mandal y Col, indicaron que las altas concentraciones de arsénico fueron tóxicas para las células y cambiaron la morfología de la bacteria a una forma alargada en

su investigación entre *Rhizobium* y *Vigna mungo* (Mandal, 2008). Prieto y Col, revelaron que las concentraciones de arsénico son acumuladas mayoritariamente en la raíz, tallo y hojas (Prieto, 2010). Por otro lado Lukaszewski y Col en 1996. Evaluaron la relación entre la nutrición del boro y la concentración de ascorbato en los apices radicales de *Curcubita pepo*, que resultó en el cese de crecimiento como síntoma aparente en la deficiencia de boro. Bolaños y Col, demostraron que la presencia de boro puede cambiar la afinidad con la cual la superficie de la célula bacteriana interactúa con el glicocalix de la membrana peribacteroidal relativa para su interacción con la matriz intracelular de glicoproteína de la planta. El – Hamdaoui y Col, evaluaron los efectos de concentraciones modificadas de boro y calcio, los mismos que indujeron los genes Nod de *Rhizobium* disminuirían significativamente, donde el boro tuvo un fuerte efecto sobre la infección e invasión celular (El-Hamdaoui, 2003).

En consecuencia no sólo se vería afectado el cultivo de alfalfa, la potencial diversidad microbiana nodulante de su raíz y con ello la fijación de nitrógeno sino también otros cultivos de importancia económica que se ven favorecidos con el nitrógeno fijado por la asociación simbiótica.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leguminosas son importantes en los sistemas productivos debido a la capacidad de aportar nitrógeno atmosférico por medio de la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno (Real, 2002) y su simbiosis es de especial importancia, porque produce el 50% de 175 millones de toneladas de fijación biológica de nitrógeno (FBN) total en todo el mundo (Ogutcu, 2008), asociación que contribuye entre 1/3 y un ½ del nitrógeno fijado de la atmósfera.

Esta fijación biológica de nitrógeno puede verse afectada indirectamente por las aguas de riego que presentan concentraciones de arsénico y boro que sobrepasan los niveles establecidos para el agua de riego en el Perú (0.05 mg/L para el As y 0.75 mg/L para el B) influyendo sobre el crecimiento de la diversidad microbiana de *Sinorhizobium meliloti* del suelo potencialmente nodulante de la raíz de *Medicago sativa* y en consecuencia de su fijación de nitrógeno. Así como también otros cultivos de importancia económica propios de la zona, que se ven favorecidos con el nitrógeno fijado por esta asociación simbiótica. Por lo tanto la interrogante del estudio es:

¿Cuál es la concentración de arsénico y boro que influirá en la FBN entre *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa in vitro*?

2. HIPÓTESIS

Las concentraciones de arsénico y boro que sobrepasan los límites permitidos para el agua de riego influirán en la fijación de nitrógeno realizada por *Sinorhizobium meliloti* aisladas y *Medicago sativa in vitro*.

3. JUSTIFICACIÓN

En el anexo de Oconchay, distrito de Ilabaya, de la provincia de Jorge Basadre Grohmann de la región de Tacna, cuya actividad principal es la agricultura, sembrando principalmente cultivos forrajeros, entre ellos *Medicago sativa* (alfalfa) con un área de 400 has, según la Dirección Regional Agraria de Tacna (2008), la que tolera una concentración de boro en el agua contenida en el suelo de 4 a 6 mg/L (la tolerancia con respecto al arsénico no es conocida). Cuya fuente principal de agua para el riego proviene del río Locumba que contiene concentraciones de 0.5 mg/L de arsénico y 7.8 mg/L de boro. La irrigación de los cultivos con aguas de alto contenido de estos metales provoca, tras la evapotranspiración, la acumulación de ellos en el suelo, convirtiendo en improductivos a los suelos agrícolas (El – Hamdaoui, 2003). Siendo la presencia de estos metales un factor negativo para el crecimiento y actividad de bacterias del suelo que establecen simbiosis con las leguminosas. Por otro lado las comunidades microbianas del suelo son capaces de hacer disponibles los metales pesados para los organismos que conforman diferentes tramas tróficas, favoreciendo los procesos de bioacumulación, biotransferencia y biomagnificación (Suárez, 2002).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Evaluar la influencia, *in vitro*, del arsénico y boro sobre la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) de *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa*.

4.2. Objetivos Específicos

- Aislar *Sinorhizobium meliloti* a partir de nódulos de *Medicago sativa*.
- Caracterizar cuantitativamente el crecimiento y desarrollo de las cepas aisladas de *Sinorhizobium meliloti* bajo la influencia de diferentes concentraciones de arsénico y boro.
- Determinar cuantitativamente el crecimiento y desarrollo de las semillas *Medicago sativa* (alfalfa) bajo la influencia de diferentes concentraciones de arsénico y boro.
- Relacionar las características cuantitativas del crecimiento y desarrollo de *Sinorhizobium meliloti* y *Medicago sativa*.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. Metales pesados

Se definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos térreos). No obstante en primer lugar, conviene clarificar que el termino metales pesados es impreciso. En verdad se pretende indicar con este término aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que a priori es beneficioso para la celula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico. (Navarro, 2007)

Las concentraciones naturales de metales pesados están relacionadas con las actividades volcánicas y los procesos de erosión de los suelos. Dentro de los contaminantes tóxicos prioritarios enumerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el registro internacional de sustancias potencialmente toxicas (TRPTC), centrandó su interés en el arsénico, cadmio, plomo y mercurio a causa de sus posibles efectos carcinógenicos para los seres humanos. (Hernandez, 1999)

Su acumulación en sedimentos y suelos, por adsorción y/o coprecipitación u otras formas de asociación natural, puede

acarrear a la larga consecuencias negativas para el entorno ecobiológico. Las variaciones del medio circundante a los sólidos y sedimentos pueden producir la lixiviación de cantidades significativamente elevadas al estado disuelto, y con ello accesibles a los sistemas acuosos y seres vivos. (Prieto et Al, 2010). Contribuyendo fuertemente a la contaminación ambiental debido a que no son biodegradables, generalmente no percola a las capas inferiores de los suelos y pueden acumularse sutilmente a concentraciones tóxicas para las plantas y animales. La duración de la contaminación por metales pesados en los suelos puede ser por cientos o miles de años. (Juárez, 2006)

Los metales pesados que ingresan en pequeñas cantidades en los suelos encuentran lugares específicos de adsorción donde son retenidos fuertemente en los coloides orgánicos e inorgánicos (Sauve et al., 2000). Adiciones continuas de metales pesados pueden acumularse en los suelos hasta alcanzar niveles tóxicos para el crecimiento de las plantas (Chang et al., 1992).

No todos los metales pesados en los suelos son el resultado de la actividad humana. Las trazas de metales pesados en los suelos son originados por procesos geológicos y formación de los suelos (Kabata-Pendias and Adriano, 1995) y la concentración de los metales pesados en el suelo es gobernado por el material parental, clima, topografía y actividades humanas. De acuerdo a Alloway y Ayres (1993) los metales pesados pueden entrar a los suelos agrícolas con el uso de pesticidas, fertilizantes, compost, estiércol,

lodos y aguas residuales que contienen trazas de estos metales. (Juárez, 2006)

La cantidad de metales disponibles en el suelo esta en función del pH, el contenido de arcillas, contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico y otras propiedades que las hacen únicas en términos de manejo de contaminación. (Juárez, 2006). Los suelos arenosos contienen menores concentraciones de metales pesados que los suelos arcillosos. (Juárez, 2006)

Existe amplia investigación sobre el riesgo de los metales pesados en la salud y el medio ambiente en la literatura. Varios autores han mostrado el riesgo de contaminación por metales pesados en el agua, en la acumulación de metales pesados en los suelos y sedimentos y en el riesgo potencial para la salud humana debido a la acumulación de metales pesados en las plantas. (Juárez, 2006)

5.2. Arsénico

La toxicidad o actividad biológica de un elemento en particular como el arsénico, sus mecanismos de transporte y propagación, movilidad o capacidad reaccionante pueden variar drásticamente dependiendo de la forma química concreta en que se encuentre y las concentraciones permisibles. (Prieto *et Al*, 2010)

El arsénico, en la forma de arsenato (As^{5+}), debido a la similaridad con el fosfato, puede participar de muchas reacciones celulares, como la sustitución del fosfato en macromoléculas de DNA, la

competición por el transportador de fosfato e inhibir la síntesis de ATP. Una vez absorbido, el arsenato puede ser reducido a arsenito (As^{3+}) e inhibir la actividad de varias enzimas, reaccionando con los grupos sulfidrílicos de las proteínas (Arantes, 2007). Existe una serie de antecedentes que indican que el arseniato compite con el fosfato como sustrato en su sistema de toma, en una amplia variedad de especies: angiospermas, musgos, líquenes, hongos y bacterias. (Carbonell et Al, 1995).

Algunas zonas donde se dan con frecuencia altas concentraciones de As son las áreas de actividad geotérmica notable, así como los suelos procedentes de roca madre de origen volcánico. El contenido de arsénico en plantas y cultivos, generalmente, aumenta con el contenido del suelo, pero puede ser pequeña en comparación con las grandes cantidades existentes en algunos suelos contaminados.

El fósforo es el material fertilizante que más influencia tiene en la toxicidad de arsénico. La toma del arseniato, pero no del arsenito. Esta es afectada por el fosfato. Esto se debe al hecho de que el arseniato y el fosfato son químicamente similares y compiten por los mismos sitios en los suelos y en los sistemas de transporte. El fósforo ha sido usado para reducir la toxicidad del arsénico, habiendo notado diversos autores una disminución en la toxicidad al aumentar los niveles de fósforo en una amplia variedad de cultivos. (Carbonell et Al, 1995)

Como el arsénico es químicamente similar al fósforo, es probable que participe en muchas reacciones celulares. Sin embargo, la incorporación del arsénico en los procesos metabólicos en las plantas superiores ha recibido poca atención. (Carbonell et Al, 1995)

El arsénico está presente en numerosos compuestos de carácter orgánico, debido a la elevada estabilidad del enlace carbono – arsénico bajo las condiciones medioambientales normales (pH y potencial redox). (Carbonell et Al, 1995)

El arsénico puede añadirse a los suelos en forma de diferentes compuesto, tanto de carácter inorgánico: arsenito y arseniato, como orgánico. El arsenito será oxidado en la mayoría de los suelos agrícolas a arseniato. (Carbonell et Al, 1995)

El arsenito es tan tóxico que simplemente destruye todos los tejidos con los que entra en contacto, probablemente por reacción con los grupos sulfhidrilos de las proteínas, causando degradación de membranas disrupción de las funciones de la raíz e incluso muerte celular y rápida necrosis si el contacto ha sido foliar. La acción del arseniato es, sin embargo, más sutil y delicada. Se conoce que desacopla la fosforilación en la mitocondria, inhibe la adsorción foliar de otros elementos químicos, y tiene un profundo efecto en los sistemas enzimáticos. (Carbonell et Al, 1995)

La persistencia del arsénico está controlada por la capacidad de adsorción del suelo y por las pérdidas que se puedan producir tanto

por lavado o lixiviación como por volatilización. (Carbonell *et Al*, 1995)

La adsorción de arsénico es dependiente del tiempo. El tiempo de equilibrio se alcanza a tiempos inferiores si trabajamos con suelos de texturas gruesas o con niveles bajos de arsénico en disolución. Menor cantidad de arsénico está presente en la fracción disponible en suelos de textura fina y este hecho implica que los residuos del elemento contaminante son potencialmente menos fitotóxicos en este tipo de suelos. (Carbonell *et Al*, 1995)

La acumulación de arsénico en las plantas puede estar afectada por muchos factores, incluyendo las especies de plantas, el tipo de compuestos utilizados, los métodos de aplicación, las condiciones del suelo y la aplicación de fertilizantes. Es raro que la acumulación de arsénico en las plantas alcance niveles perjudiciales para los seres vivos, porque invariablemente el crecimiento es reducido antes de que el contenido alcance niveles tóxicos. (Carbonell *et Al*, 1995)

Si observamos crecimientos pobres en el cultivo de alfalfa y cebada, estos se deberán al arsénico soluble de los suelos. (Carbonell *et Al*, 1995)

Los residuos de arsénico en plantas pueden ser relacionados con los niveles de arsénico en el suelo, pero existen muchas dificultades para obtener buenas correlaciones. (Carbonell *et Al*, 1995)

Existen diferencias en la toma de arsénico y en la variación de las concentraciones en planta según la toma entre cultivos de invierno y verano, incluso con los mismos niveles de arsénico disponibles. (Carbonell *et Al*, 1995)

Una explicación que se ha sugerido es que el frío y la humedad del invierno hacen que la transpiración y absorción de agua y arsénico sea mucho menor que la que se da en cultivos de verano. (Carbonell *et Al*, 1995)

5.3. Boro

El átomo de B es de los más pequeños, con sólo tres electrones de valencia, lo que le confiere una deficiencia de electrones que lo destacan, después del átomo de carbono, con una de las químicas más interesantes y diversas hasta ahora estudiadas. En la mayoría de los fluidos biológicos, el B existe principalmente como ácido bórico, $B(OH)_3$ ($\approx 96\%$), y una pequeña cantidad del anión borato.

Debido a la tan llamada deficiencia de electrones del B, ambas especies reaccionan rápidamente para formar complejos con una variedad de azúcares y otros compuestos que contienen grupos cis-diol, generando ésteres de boratos cíclicos estables, sugiriéndose que la clave de la esencialidad del B radica en la estabilización de moléculas de importancia biológica en diferentes organismos, lo cual está aún en debate.

Sobre la base de la mayor estabilidad de los borato di-ésteres en sistemas acuosos y de la distribución de sitios de enlace cis-diol en células, es más probable que en estas moléculas el B juegue funciones metabólicas más relevantes de lo que lo haría en moléculas mono-ésteres, cuya formación es menos favorecida debido a las condiciones químicas en sistemas vivientes más apropiadas para la generación de moléculas suficientemente estables como los di-ésteres.

El B es un importante micronutriente con un difícil manejo debido a que su movilidad en el floema varía marcadamente entre las especies vegetales con síntomas de deficiencia y toxicidad en un rango bastante estrecho. Las recientes revisiones proponen que este elemento está involucrado en tres procesos principales que incluyen: preservación de la estructura de la pared celular, mantenimiento de las funciones de la membrana y cofactor de las actividades metabólicas. Las evidencias han indicado que la esencialidad del boro en las plantas está relacionada con su capacidad para formar puentes diésteres con grupos cis-diol para producir moléculas estables como el complejo B-ramnogalacturonano II fundamental en la estructura de la pared celular.

El boro es otro de los elementos del suelo críticos para el crecimiento de las leguminosas en general. (Quiñonez, 2003)

Brady y Weil reportan que el boro es esencial en la división celular en el proceso de la formación del nódulo (Yakubu, 2010). Pues

interfiere en el desarrollo normal del nódulo, la translocación y el funcionamiento de azúcares, N y P de las raíces en los nódulos. (Yakubu, 2010)

De acuerdo a Zehirov y Georgiev, la deficiencia de boro puede causar reducción en el número de nódulos e incrementar el tamaño de los nódulos. Esto también fue observado que la inanición de boro inhibe el desarrollo de la pared celular y cambios en la permeabilidad celular. (Yakubu, 2010)

Una observación similar fue realizada por Rondon *et Al*, que remarca el incremento en el porcentaje de nitrógeno derivado de fijación debido a la fertilización de boro, indicando el rol específico en la función del nódulo. (Yakubu, 2010)

Bolaños *et Al*. reportó que la deficiencia de B conduce a la formación anormal de nódulos (conteniendo bacteroides en el área infectada) y el contenido fenólico es reducido, los cuales pueden conducir a la reducción del rendimiento de la nodulación y una velocidad baja de fijación de nitrógeno. (Yakubu, 2010)

5.4. Calidad de agua de riego

El término contaminación, según la Unión Europea es, “la introducción directa o indirecta como consecuencia de la actividad humana de sustancias, vibraciones, calor o ruido en el aire, el agua o suelo que pueden ser nocivos para la salud humana o la calidad del medio ambiente, causar daños a la propiedad material o

perjudicar o entorpecer las actividades recreativas y otros usos legítimos de medio ambiente”. (Navarro, 2007)

Es así que, según el informe N° 949-2007/DSB/DIGESA, los resultados de todas las muestras analizadas (03368,03369 y 03370) se observa la elevada concentración de arsénico (0.08514, 0.06777 y 0.01658 mg/L respectivamente), entre 1.6 a 8.5 veces más de acuerdo a los recomendado con la Organización Mundial de la Salud (OMS).

El río Locumba y sus afluentes los ríos Salado, Ilabaya y Curibaya, debido a que sus aguas utilizadas para riego, se definen de Clase III: “Aguas para regadío de vegetales de consumo crudo y bebidas de animales”, según Informe N° 001581-2008/DEPA – APRHI/DIGESA, donde los valores de arsénico no cumplen con las normas establecidas, teniendo la ley de aguas clase III debe ser menor de 0.05 mg/L, sin embargo los resultados revelaron que el promedio de esta última es de 0,4948 mg/L.

Cuadro 1. Valores de concentraciones de As en el periodo 2005-2008

	As (mg/L)	T°	pH
2005	1.7147	18.10	8.33
2006	0.2104	23.20	7.94
2007	0.8966	23.60	8.02
2008	0.5049	23.30	7.82

5.5. *Medicago sativa*

La alfalfa es una forrajera de ciclo perenne el género *Medicago* tiene como centro de origen el Medio Oriente. Pertenece al orden de las leguminosas, super familia de las leguminosas, familia Fabacea. (Araldi, 2009)

Posee gran adaptación agronómica y efectividad en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), bien como elevado contenido proteico y sustancias que estimulan la secreción láctea. (Araldi, 2009)

Es una planta cosmopolita, capaz de sobrevivir desde temperaturas bajo -25 °C hasta encima de 50°C. Presenta mayor tolerancia a la seca debido a su sistema de raíces, pivotantes y profundos. (Araldi, 2009)

Uno de los factores más importantes en el mejoramiento genético de leguminosas es la manutención o incremento de la eficiencia de la fijación biológica de nitrógeno. Cuando ese proceso es efectivo, la fertilización nitrogenada puede ser dispensada, lo que constituye una de las grandes ventajas de las leguminosas en relación a las gramíneas. (Araldi, 2009)

En raíces, todos los aniones son fuertemente adsorbidos a la superficie de la membrana, posteriormente sigue una conducción metabólica, una transferencia selectiva al simplasto y por ultimo son

transportados a la parte superior de la planta. En particular la adsorción del arsenito y del arseniato en la superficie radicular externa es bastante rápida e intensa, obteniéndose de esta forma concentraciones muy altas de arsénico en las raíces de plantas que se desarrollan en cultivo hidropónico. (Carbonell et Al, 1995)

5.6. Género *Sinorhizobium*

Las cepas del género *Sinorhizobium* son productoras de ácido y de rápido crecimiento. Al igual que *Rhizobium* contienen genes *nod*, *nif* y los que controlan la especificidad de la infección radicular (*hen*) en los plasmidios de gran longitud (*pSym*). *Sinorhizobium* posee especies que pueden tener grupos diferentes de genes *nod*, a pesar de poseer el mismo genotipo. *Sinorhizobium* forma nódulos en melilotis, *Medicago* y *Trigonella*, esta especie presenta dos grupos claramente definidos que pudieran resultar dos especies diferentes. (Bécquer, 2004)

Las especies de este género producen dos exopolisacáridos: succinoglucano (EPS I) y galactoglucano (EPS II). Es sabido que por lo menos uno de ellos es esencial en el establecimiento de la interacción simbiótica con *Medicago sativa*. (Moreira et al, 2000)

Las bacterias diazotróficas tales como bacterias simbióticas son microorganismos benéficos en la zona radical de las plantas leguminosas informado como muy esenciales para el funcionamiento de la planta y crecimiento, especialmente bajo condiciones de nutrientes desequilibrados. (Ardakani, 2009)

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, también llamadas diazotróficas, son la principal vía de incorporación de nitrógeno al ecosistema, que es constantemente reciclado, volviendo a la atmósfera por la acción de otros organismos descomponedores de materia orgánica en el suelo. Se estima que sean fijados por año aproximadamente 180×10^6 toneladas de nitrógeno a través del proceso de fijación biológica realizada por los diazótrofos del mundo, corresponde a por lo menos dos veces más de aquellos que comprenden la fijación química o industrial. Estos números demuestran la importancia ambiental y económica de esos microorganismos, una vez que la FBN mantiene el ecosistema en equilibrio, evitando la contaminación de las aguas y del suelo por residuos nitrogenados indeseables que son liberados en el proceso industrial de fijación de nitrógeno.

Talvez la principal función de los exopolisacáridos en la fisiología microbiana sea la de promover la adhesión de las células, formando agregados. Agregados de células bacterianas envueltas por EPS forman una matriz altamente organizada e hidratada en la cual múltiples capas de células están embebidas. La existencia de esta matriz confiere a las células una serie de ventajas selectivas, tales como la adhesión a las superficies, protección contra variaciones bruscas en el macroambiente, aumento de la variabilidad antigénica, retención de los iones y nutrientes, resistencia a la desecación y protección mecánica. La verdadera función de los EPS, depende de la ecología de la célula bacteriana que lo produce.

Aunque, algunos exopolisacáridos son importantes en la interacción de las células bacterianas con células eucariotas. (Vassoler, 2008)

En la actualidad, la taxonomía de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos, y no se pueden adelantar estudios de tipo genético si no se han identificado sus propiedades fenotípicas. Se estima que los rizobios no conocidos en el mundo representan un recurso biológico porque las leguminosas son uno de los grupos de plantas más grande y diverso y se encuentran distribuidas en distintos ecosistemas. (Cuadrado et al, 2009)

5.7. Fijación de nitrógeno

Con relación a las cantidades de nitrógeno fijado simbióticamente, estas son muy variadas, dependiendo principalmente de la especie leguminosa, de la efectividad del rizobio, de las condiciones edafoclimáticas, del manejo del cultivo y eventualmente, del manejo del ganado.

La ciencia ha demostrado que la vía normal de ingreso de N_2 a las plantas proviene del suelo, y para ser absorbido, se debe encontrar mineralizado, como nitrato (NO_3) y amonio (NH_3). Sin embargo, debido a que se acumula principalmente en formas orgánicas en el suelo, se hace necesaria su transformación microbiana, conocida como mineralización de nitrógeno, para dejarlo disponible para las plantas.

Diversos factores pueden afectar la simbiosis impidiendo la aparición de nódulos y como consecuencia de ello la leguminosa puede morir, salvo que el suelo sea muy rico en derivados nitrogenados. Dentro de estos se encuentran: 1) factores químicos: concentración de cloruro de sodio, metales, temperatura, pH, niveles tóxicos de aluminio o manganeso y bajos niveles de calcio, magnesio, potasio y molibdeno; 2) factores físicos: la erosión, presencia de malezas, compactación, hidromorfismo, entre otros y 3) factores biológicos: presencia de virus y bacterias que inhiben la nodulación, una de ellas el *Bdellovibrio*. (Cuadrado et al, 2009)

Por otro lado, el 97% de la actividad NR nodular esta localizada en los bacteroides. La primera explicación de la disminución en la eficiencia de fijación de N_2 como el efecto de competencia para el poder reductor entre nitrogenasa y NR.

Es conocido que la concentración de oxígeno libre dentro de los nódulos es el mayor factor afectante de la actividad de la nitrogenasa. La evaluación del oxígeno en la zona infectada del nódulo radicular es controlada por la planta hospedera.

El nitrógeno molecular (N_2) es el mayor componente (aproximadamente 80%) de la atmosfera de la tierra. El elemento de nitrógeno es un esencial parte de muchos de los componentes químicos, tales como proteínas y acidos nucleicos, los cuales son las bases de toda forma de vida. Sin embargo, N_2 no puede ser usado directamente por sistemas biológicos para construir los químicos

requeridos para el crecimiento y reproducción. Antes su incorporación dentro del sistema de la vida N_2 debe primero ser combinado con el elemento hidrógeno. Este proceso de reducción de N_2 , comúnmente referida como fijación de nitrógeno puede ser consumado químicamente o biológicamente.

La reducción de nitrógeno, si logrado química o biológicamente, requiere una gran cantidad de energía. El proceso químico usado para producir fertilizantes utiliza grandes cantidades de combustibles fósiles como fuente de energía. Estos materiales son irremplazables y finalmente, exhaustibles. La FBN obtiene la energía requerida de la oxidación de carbohidratos el cual ha sido formado por la actividad fotosintético de plantas verdes. La energía para la fotosíntesis comienza de luz solar. La energía para FBN es por lo tanto indirectamente derivada de una universalmente disponible y fuente inxhaustible. El origen directo de la energía (carbohidrato) para FBN es por lo tanto potencialmente disponible siempre que sea en condiciones que permita el crecimiento de los organismos fotosintéticos.

La habilidad de un sistema biológico para fijar nitrógeno es dependiente de la presencia de un sistema particular de enzimas conocidas como nitrogenasa, la cual cataliza la conversión de N_2 en una forma reducida (amonio combinado con ciertos compuestos orgánicos) los cuales pueden entonces ser usados para crecimiento por microorganismos y formas de vida superiores. El sistema de nitrogenasa consiste de dos diferentes moléculas de proteínas

(enzimas) las cuales deben su función juntos en el proceso de fijación de nitrógeno. Una de las enzimas (azoferredoxina) es una proteína que contiene Fe. La segunda enzima (molibdoferredoxina) contiene ambos hierro y molibdeno. Los dos componentes combinan y funcionan juntos un simple sistema. Los componentes del sistema de la nitrogenasa de diferentes organismos ha sido combinada a una forma “hibrido activo” sistema nitrogenasa, indicando un apariencia general similar en el sistema FBN derivado de diferentes organismos. Nitrogenasa ha sido ahora detectada sólo en ciertos microorganismos.

De acuerdo con Skot et al. (1983) y Puppo et al. (2005), la diferente combinación entre cepas bacterianas y la planta hospedera permite plasticidad en la formación del nódulo, por ejemplo la disminución del número de nódulos conduce a nódulos más grandes con alta actividad de fijación de nitrógeno. (Hristozkova et al. 2008)

El genotipo de la cepa tiene un importante efecto sobre la efectividad del sistema simbiótico, afectando variables como el número y la actividad de la nitrogenasa en los nódulos. El comportamiento de ambos – el sistema de fijación de nitrógeno bajo y condiciones de deficiencia de nitrógeno es considerada. (Hristozkova et al. 2008)

Las diferencias fueron establecidas por la variación de formación de nódulos y participación de la actividad enzimática en la fijación de nitrógeno y asimilación: nitrogenasa, glutamina sintetasa y nitrato reductasa. (Hristozkova et al. 2008)

La insuficiencia de suministro de molibdeno conduce a la reducción significativa de la actividad de fijación de nitrógeno. El efecto negativo de exclusión de Mo del medio nutritivo sobre la actividad de las enzimas está relacionado a la asimilación primaria de nitrógeno y la acumulación de biomasa. Se encontró que la alfalfa es más sensible a la inanición de Mo que la planta de arveja. (Hristozkova et al. 2008)

Es bien conocido que las leguminosas poseen un sistema de control regulatorio capaz de detectar la presencia de nitrógeno combinado en la rizosfera y bloquear la nodulación en respuesta. (Hristozkova et al. 2008)

El rol de la fijación biológica de nitrógeno es bien conocido por mucho tiempo como una forma no contaminante y costo efectivo para mejorar la fertilidad del suelo. Rizobios, tales como *S. meliloti*, deben ser capaces de persistir a la competencia en la mayoría de suelos con escasez de nutrientes, la competencia para la colonización de la rizosfera y la infección de la planta, y adaptar su metabolismo al nutricionalmente más favorable, distintas condiciones dentro de las células vegetales en los nódulos. Estos tres modos diferentes de existencia ejemplifica la necesidad de alto grado fisiológico de adaptabilidad, mecanismos genéticos específicos para detectar cambios en condiciones medioambientales, y en la habilidad para responder rápidamente. (Hristozkova et al. 2008)

Un suministro insuficiente de molibdeno permite obtener una reducción significativa de la actividad de fijación de nitrógeno.

El efecto negativo de la exclusión Mo de un medio nutritivo sobre la actividad de las enzimas está relacionado con la asimilación de nitrógeno primaria y la acumulación de biomasa. Se encontró que la alfalfa es más sensible a la inanición de Mo que las plantas del guisante. El papel del Mo como nutriente de las plantas está relacionado con su función como un componente metálico de algunas enzimas que catalizan la fijación de nitrógeno, la asimilación y reducción del nitrato. (Hristozkova Et al, 2008)

Según Neves & Rumjanek, (1992), la fijación de nitrógeno atmosférico comprende la ruptura del triple enlace de la molécula de N_2 posibilitando la reducción de nitrógeno, con consumo de energía. (Araldi, 2009)

El requerimiento de la energía también es alto y proviene de la oxidación de compuestos originados por las leguminosas en el proceso de fotosíntesis. (Araldi, 2009)

En relación a la cantidad de nitrógeno que puede ser fijado a través de la FBN, Vance et al., (1988), admiten la cantidad de 450 Kg/ha/año de nitrógeno como potencial para la simbiosis alfalfa / *Sinorhizobium* spp L. Heichel et al., (1984), estiman que la fijación en clima temperado varía entre 170 a 224 kg/ha. (Araldi, 2009)

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material Biológico

6.1.1. Microorganismo y medios de cultivo

Se emplearon cepas nativas de *Sinorhizobium meliloti* obtenidas a partir de nódulos de *Medicago sativa* (alfalfa).

El medio de cultivo empleado en el crecimiento, preparación de inóculos y conservación de cepas fue Agar levadura manitol con rojo de congo (LMA - RC).

Los medios de cultivo empleados para las pruebas de pureza fueron: Agar levadura lactosa (LLA); y Agar peptona glucosa con el indicador de púrpura de bromocresol (PGA - PBC). Para la caracterización fenotípica de *Sinorhizobium meliloti*, se usó el medio LMA - RC con las concentraciones de NaCl de 10 y 20 g/L (1% y 2% respectivamente), Caldo Levadura Manitol con azul de bromotimol al 0,5 % (10 ml/L).

En la conservación de las bacterias para uso rutinario se utilizaron placas de petri mantenidas a 4°C y resembradas cada 2 ó 3 meses. Al mismo tiempo se conservaron las cepas en microviales a 4°C en glicerol al 20% (v/v)

El pH de los medios se ajustaron a 6.8 con NaOH y HCL. La esterilización se llevó a cabo en autoclave, a 121°C durante 15 min.

6.1.2. Material vegetal

Se emplearon las semillas de *Medicago sativa*, que fueron colectadas a partir de las vainas de la planta en estadio de floración, conservadas en viales en lugar fresco, y transportadas al Laboratorio de Micología y Virología de la UNJBG.

6.2. Diseño Experimental:

Para la evaluación de la influencia de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de arsénico y boro, se utilizó el diseño de bloques con 5 tratamientos (concentraciones) y 38 repeticiones (cepas) para el caso del arsénico y de 4 tratamientos (concentraciones) y 38 repeticiones (cepas) para el caso del boro.

Para la evaluación de las semillas de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de arsénico y boro, se determinaron los índices de germinación, velocidad de germinación, índices de crecimiento y velocidad de crecimiento, para los que se empleó el diseño de bloques con 5 tratamientos (concentraciones) y 4 repeticiones (índices) para el caso del arsénico y se empleó el diseño de bloques con 4 tratamientos (concentraciones) y 4 repeticiones (índices) para el caso del boro.

Para la evaluación del número de semillas con respecto al tipo de emergencia (emergencia completa, emergencia incompleta y no emergidos) se empleo el diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 5 (concentraciones) x 3 (tipos de emergencia) con una combinación de 15 tratamientos y 10 repeticiones. Para la evaluación de la longitud radicular se empleo el diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 5 (concentraciones) x 2 (tipos de emergencia) con una combinación de 10 tratamientos y 10 repeticiones.

Población: Semilla de *Medicago sativa* y cepas aisladas de *Sinorhizobium meliloti*

Las Variables para el siguiente estudio son:

Variable Independiente

Concentraciones de arsénico

Concetraciones de boro

Variable dependiente

Densidad Óptica de biomasa microbiana de *Sinorhizobium meliloti*

Indice de germinación

Indice de crecimiento

Número de semillas emergentes

6.3. Metodología

6.3.1. Obtención de nódulos de *Medicago sativa*

Se removió las raíces y mala hierba alrededor de la planta en estudio. Con la ayuda de una pala pequeña con un radio aproximadamente de 15 cm se cavó una profundidad de 20 cm. La tierra circundante a las raíces secundarias fue removida con ayuda de pinceles y una vez ubicado el nódulo se lo roció con agua corriente, con la ayuda de un frasco con dispositivo en spray, para no dañar las raíces. Se colectó el nódulo con la ayuda de tijeras realizando cortes en la raíz anterior y posterior al nódulo. De las raíces de cada planta se colectaron un total de 33 nódulos de buen aspecto.

Los nódulos colectados fueron colocados en viales que contenían una capa de sílica gel y una capa de algodón. Para luego ser transportados al laboratorio de Micología y Virología de la Facultad de Ciencias de la UNJBG.

6.3.2. Aislamiento de *Sinorhizobium meliloti*

Los nódulos se maceraron con la ayuda de una varilla de vidrio esteril dentro de viales estériles conteniendo 0.5 mL aprox de agua destilada estéril. Luego se sembró una asada del macerado en placas petri con LMA – RC, en condiciones de laboratorio.

Posteriormente se incubaron a 28 °C por 10 días, tiempo en el cual se realizaron evaluaciones diarias a fin de obtener cultivos puros de las colonias crecidas desde las 48 horas en adelante. Los cuales fueron repicados en el mismo medio hasta la obtención de cultivos uniformes y libres de impurezas.

6.3.3. Pruebas de pureza

A las cepas aisladas obtenidas se les realizó una coloración gram, pues las colonias seleccionadas debían estar formadas por bacterias gram negativas y ser de tipo bacilar.

Se evaluó las características de crecimiento en el APG - PB, las que se incubaron a 28 °C por cinco días. El crecimiento acompañado con un cambio de pH indicaba la presencia de un contaminante, debido a que los rizobios no crecen en este medio.

Se evaluó en agar LLA, y se incubaron a 28 °C hasta lograr un buen crecimiento de las colonias. Luego se cubrieron las cajas con 15 mL del reactivo de Benedict por 10 min. La formación de un color amarillo después de este lapso indicaba la presencia de *Agrobacterium sp*, un contaminante frecuente capaz de inducir la nodulación pero no fijar el nitrógeno.

Variación de pH en LMC, las cepas se sembraron en caldo por 15 días, al cabo del cual se midió el pH teniendo presente que

un pH menor a 5,5 o mayor de 8 indicaba la presencia de microorganismos contaminantes.(Cuadrado, 2009)

6.3.4. Caracterización fenotípica de *Sinorhizobium meliloti*

Para la evaluación de velocidad de crecimiento en medio LMA – RC (tiempo máximo de incubación: 15 días), se evaluaron tamaño de las colonias, forma, textura y color.

Para la evaluación de producción de acidez se sembraron las cepas en caldo LMC con azul de bromotimol, y se incubaron por 3 días, observándose el viraje de color, hacia amarillo si el pH era ácido y hacia azul si el pH era alcalino.

Para evaluar la tolerancia al cloruro de sodio (NaCl) se tomaron inóculos de 25 µL de tubos con LMC de cada cepa conteniendo 10⁹ bacterias/mL, realizando una siembra en gota en placas de petri dividida en 9 cuadrantes conteniendo medio LMA al 1 y 2 %, que luego fueron incubadas a 28°C por 5 días.

Se realizó la siembra en gota, explicada anteriormente, en placas de petri conteniendo medio LMA, e incubadas a las temperaturas de 4, 28 y 40 °C.

6.3.5. Autenticación

Se desinfectaron las semillas de *Medicago sativa* colectadas utilizando hipoclorito de sodio al 2% durante 5 minutos, se enjuagaron con agua destilada esteril varias veces cada 5

minutos, se hidrataron las semillas en vasos de precipitación con 400 ml de agua destilada esteril por 1 hora. Se colocaron las semillas en placas de petri conteniendo papel filtro estéril humedecido con agua esteril. Se protegieron las placas de la luz con papel oscuro mantenidas a 24°C por un periodo de 24 a 72 horas aproximadamente.

Se preparó un inóculo de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas en caldo levadura manitol, incubadas a 28°C por 4 días hasta obtener una población bacteriana de 10^8 cel/ml.

Para la autenticación se escogieron las radículas de las semillas germinadas de *Medicago sativa*, que fueron transferidas a tubos de ensayo con 10 ml aprox del medio Jensen para leguminosas. Los tubos fueron cubiertos en su parte externa inferior para proporcionar la oscuridad necesaria a la raíz. Se proporcionó 12 horas de luz blanca y directa utilizando focos fluorescentes de 40 watts y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 18 - 22°C. Se reportó como nod (+) aquellas radículas de *Medicago sativa* que presentaron nódulos.

6.3.6. Preparación de concentraciones de arsénico y boro

Para la preparación de las concentraciones de arsénico se usó un patrón de Trióxido de arsénico de 1000 ppm (Arsénico de referencia certificado), teniendo en cuenta que mg/L = ppm. Se obtuvieron 5 concentraciones de arsénico: 0.1, 0.15, 0.25, 0.5 y

0.75 mg/L, las que se obtuvieron a partir de la concentración inicial diluída con agua destilada esteril hasta obtener la concentración deseada.

Fórmula empleada:

$$C_i.V_i = C_f.V_f$$

Donde:

C_i: Concentración inicial

V_i: Volumen inicial

C_f: Concentración final

V_f: Volumen final

Para la preparación de las concentraciones de boro se usó H₃BO₃, se hicieron los siguientes cálculos.

Se determinó que:



$$61.83 \text{ mg} \quad \rightarrow \quad 10.811 \text{ mg}$$

$$X \quad \rightarrow \quad 5 \text{ mg}$$

$$X = 28.5958 \text{ mg.}$$

Se tiene que: $28.5958 \text{ mg de H}_3\text{BO}_3 \times (100 \text{ mg reactivo/ } 99.2 \text{ mg reactivo}) = 28.8264 \text{ mg de H}_3\text{BO}_3$

Por lo tanto para obtener una solución de 50 ppm de B, se pesó 0.02882 g de H_3BO_3 y se diluyó en 100 ml de agua destilada estéril. Apartir de esta solución se utilizó la misma fórmula de $C_i.V_i=C_f.V_f$ para obtener las 4 concentraciones de boro necesitadas (5,8; 6,8; 7,8; 8,8 mg/L).

6.3.7. Evaluación de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*

Se prepararon inóculos de cada cepa en tubos conteniendo LMC con 10^9 cel/ml. a partir de los cuales fueron sembrados con una asada hacia tubos conteniendo medio LMA con diferentes concentraciones de As (0,1; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L) y B (5,8; 6,8; 7,8; 8,8 mg/L), e incubados a 25 °C por 3 a 4 días, luego se realizó la lectura la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm, para realizar la cuantificación por densidad óptica de biomasa.

6.3.8. Evaluación de las semillas de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*

Se evaluó el número de semillas germinadas, tiempo de germinación y la longitud de las radículas germinadas, para lo cual se desinfectaron las semillas de acuerdo a Zuñiga *et al*

(2008). Se colocaron las semillas en placas de petri con agar al 0,8 % a diferentes concentraciones de As (0,1, 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L) y B (5,8; 6,8; 7,8; 8,8 mg/L), por un periodo de 5 días, con evaluaciones diarias. Los resultados serán expresados en Indices de germinación, velocidad de germinación e Indices de crecimiento y velocidad de crecimiento.

Los cálculos para el Índice de germinación y velocidad de germinación están dados por:

Índice de germinación:

$$G = \frac{N_1 \times G_1 + N_2 \times G_2 + \dots + N_n \times G_n}{G_1 + G_2 + \dots + G_n} = \frac{\sum_{i=1}^n N_i G_i}{\sum_{i=1}^n G_i} \quad (1)$$

Dónde:

$N_1, N_2, N_3, \dots, N_n$: Representan número de días desde la iniciación del ensayo de germinación.

G_1, G_2, \dots, G_n : Representan el número de semillas germinadas en el día i -ésimo.

Se observa que el valor G es una media aritmética de los N_i (Días necesarios para la germinación) ponderada por los G_i y por ello su unidad es días.

Índice de velocidad de germinación:

Es uno de los más utilizados y se expresa como número de semillas germinadas por día. Su fórmula de cálculo es:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_i}{N_i} + \dots + \frac{G_n}{N_n} = \sum_{i=1}^n \frac{G_i}{N_i}$$

En donde N_i y G_i tienen el mismo significado que en la fórmula anterior.

Para los índices de crecimiento y velocidad de crecimiento se tomaron las mismas fórmulas reemplazando el número de semillas por la longitud de la radícula.

Se evaluaron los tipos de emergencia de las semillas de *Medicago sativa*, para esto, se colocaron las semillas desinfectadas a 2 cm de la superficie en vasos de plástico de primer uso conteniendo 5 g de arena estéril como sustrato, a los que se les adicionó agua destilada estéril a diferentes concentraciones de As en proporción 1:1 (0,1; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L) y B (5,8; 6,8; 7,8; 8,8; 0,75 mg/L), por un periodo de 3 a 7 días, con evaluaciones diarias, durante este periodo se adicionó sólo agua destilada esteril para mantener la humedad, a una temperatura de 25°C . Se obtuvo datos del número de semillas emergidas, número y longitud de semillas con

emergencia completa y el número y longitud de las semillas con emergencia incompleta. Se consideró como plántula emergida cuando se mostraron los cotiledones perpendiculares al hipocótilo erecto.

6.3.9 Análisis estadístico

Para el análisis de las variables en estudio se utilizó la técnica de análisis de varianza, se trabajó con un nivel de significación de 0,05 y 0,01. Para la comparación de medias entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey a una probabilidad $\alpha = 0,05$.

Para el análisis de datos se empleó el programa estadístico STATGRAPHICS versión 5,1.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de *Sinorhizobium meliloti*

Se aislaron 69 cepas de las cuales, luego de un screening, 38 se confirmaron como cepas pertenecientes *Sinorhizobium meliloti*, aisladas previamente de *Medicago sativa* (planta hospedera).

Cuadro 2. Características generales de los aislamientos realizados

Número de aislamientos	69
Origen de los aislamientos	Ilabaya.
Variedad de alfalfa	Curibaya
Uso	Forraje

Fuente: Elaboración propia

7.2. Pruebas de Pureza

El evaluación de las 69 cepas en medio PG dieron en su mayoría un crecimiento negativo, exceptuando a las cepas NA5.1 y NA6.1, las que tuvieron un crecimiento moderado o normal virando el medio hacia amarillo, indicando la acidificación del mismo, como producto de la degradación de la fuente carbono del medio (Glucosa), característica que no es propia de la bacteria en estudio. En cuanto al crecimiento en medio LLA, 6 cepas dieron un crecimiento negativo, 34 un crecimiento escaso y 30 un crecimiento normal, sin embargo todas revelaron tener un reacción negativa al ser sometidas al reactivo de Benedict por 10 min.

Cuadro 3. Pruebas de pureza realizadas a las cepas aisladas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas.

Pruebas de pureza	Cepas			
	negativos	positivos	negativos	positivos
Crec. en PGA-PB	67	2	97.10%	2.90%
Reacción LLA	69	0	100%	0%

Fuente: Elaboración propia

7.3 Caracterización fenotípica de *Sinorhizobium meliloti*

Cuadro 4. Caracterización morfológica de las cepas aisladas de *Sinorhizobium meliloti* en medio LMA.

	Atributos	Número de colonias	Porcentaje %
velocidad de crecimiento (dias)	3	1	1.49
	4	51	76.12
	5	14	20.90
	6	1	1.49
diametro de colonia (mm)	<1	10	14.93
	1	44	65.67
	1.5	8	11.94
	2	3	4.48
	2.5	1	1.49
	4	1	1.49

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 5. Caracterización morfológica de las cepas aisladas de *Sinorhizobium meliloti* en medio LMA. (Continuación)

	Atributos	Número de colonias	Porcentaje %
Morfología	li,o,f,a,g	15	22.39
	li,o,go,g	6	8.96
	li,t,f,ap	2	2.99
	li,o,f,g	15	22.39
	li,o,go,a,g	14	20.90
	li,t,f,g,a,o	2	2.99
	cu,o,go,g	7	10.45
	li,o,a,g	6	8.96
Mucosidad	regular	60	89.55
	poca	5	7.46
	abundante	2	2.99
pH	5.59 - 6.00	13	19.40
	6.03 - 6.53	11	16.42
	6.55 - 7.15	14	20.90
	< 5.5	29	43.28
Autenticación	Nod (+)	38	

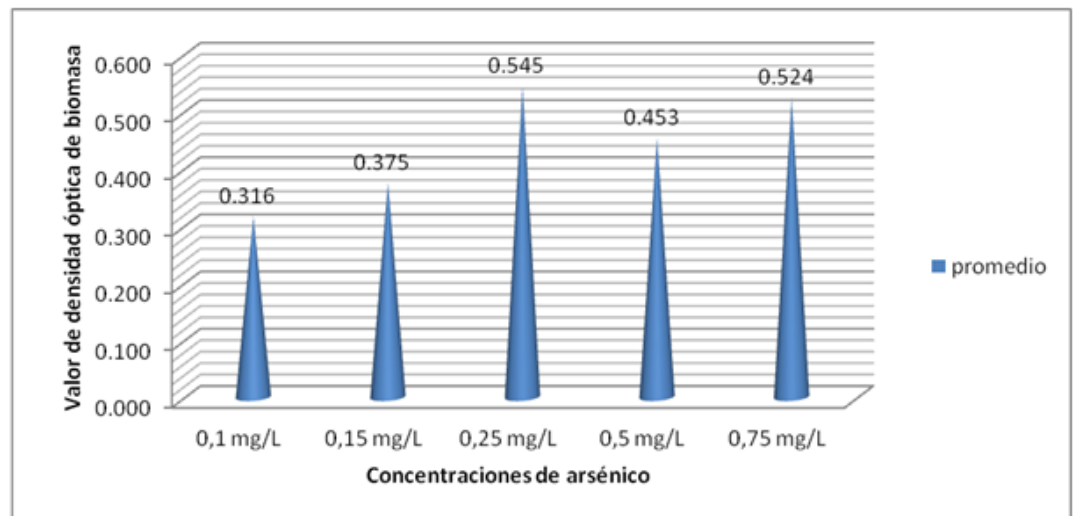
Fuente: Elaboración propia

Cuadro 6. Caracterización de los agentes físico – químicos sobre el crecimiento de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas.

Agentes Físico químicos	NaCl				T°					
	1%	Porcentaje (%)	2%	Porcentaje (%)	4°C	Porcentaje (%)	28°C	Porcentaje (%)	42°C	Porcentaje (%)
Crecimiento abundante	0	0.00	0	0.00	0	0.00	36	94.74	0	0
Crecimiento moderado o normal	33	86.84	13	34.21	6	15.79	2	5.26	0	0
Crecimiento escaso	4	10.53	23	60.53	22	57.89	0	0.00	0	0
No hubo crecimiento	1	2.63	2	5.26	10	26.32	0	0.00	38	100
Total	38	100.00	38	100.00	38	100.00	38	100.00	38	100

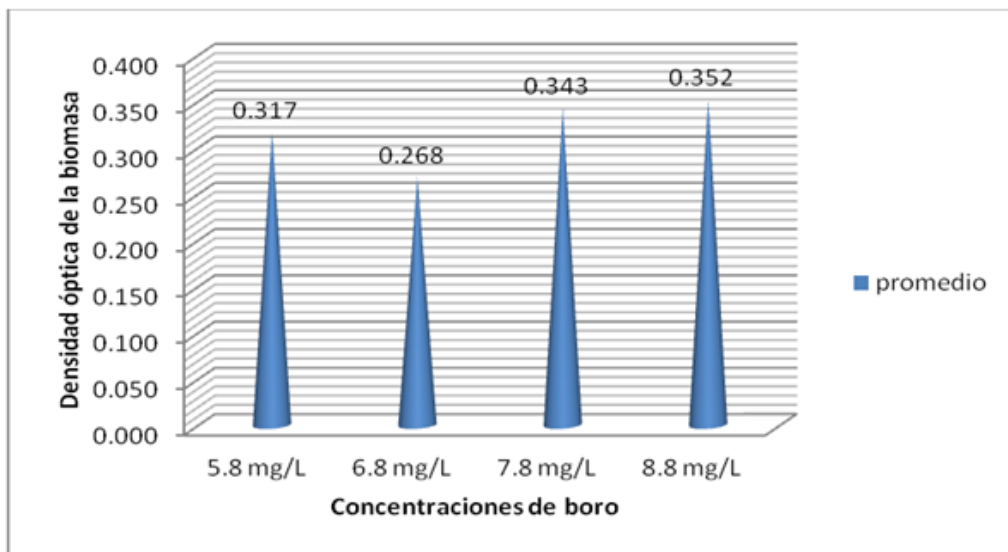
Fuente: Elaboración propia

7.4 Evaluación de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*



Fuente: Elaboración propia

Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de arsénico en la densidad óptica de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas.



Fuente: Elaboración propia

Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de boro en la densidad óptica de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas.

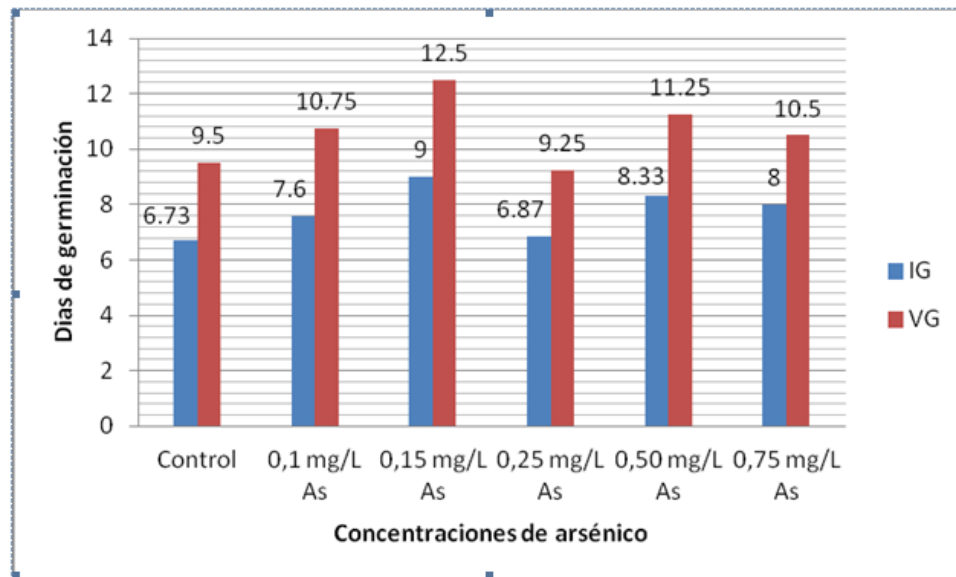
7.5 Evaluación de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*

Esta prueba duró 72 horas, considerando germinadas las semillas cuando presentaban emergencia de la radícula. El índice de germinación (IG), definido como la medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad germinativa, y la velocidad de germinación (VG), definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación.

Cuadro 7. Evaluación de índice de germinación, índice de crecimiento, velocidad de germinación y velocidad de crecimiento de las semillas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de arsénico *in vitro*.

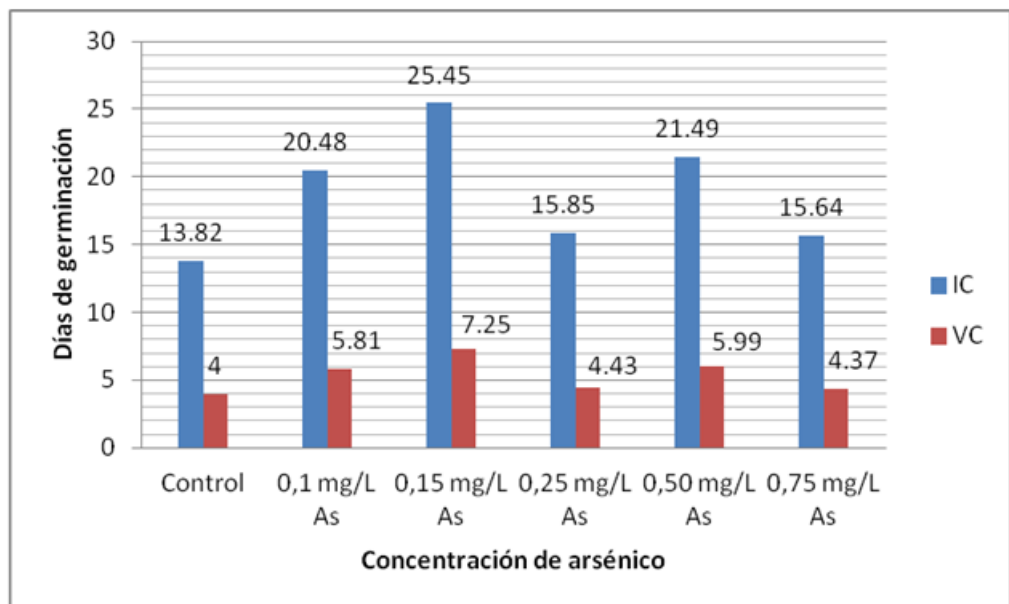
Arsénico				
Indices	IG	VG	IC	VC
Control	6.73	9.50	13.82	4.00
0,1 mg/L As	7.60	10.75	20.48	5.81
0,15 mg/L As	9.00	12.50	25.45	7.25
0,25 mg/L As	6.87	9.25	15.85	4.43
0,50 mg/L As	8.33	11.25	21.49	5.99
0,75 mg/L As	8.00	10.50	15.64	4.37

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 3. Evaluación de índice de germinación y velocidad de germinación de las semillas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de arsénico *in vitro*.



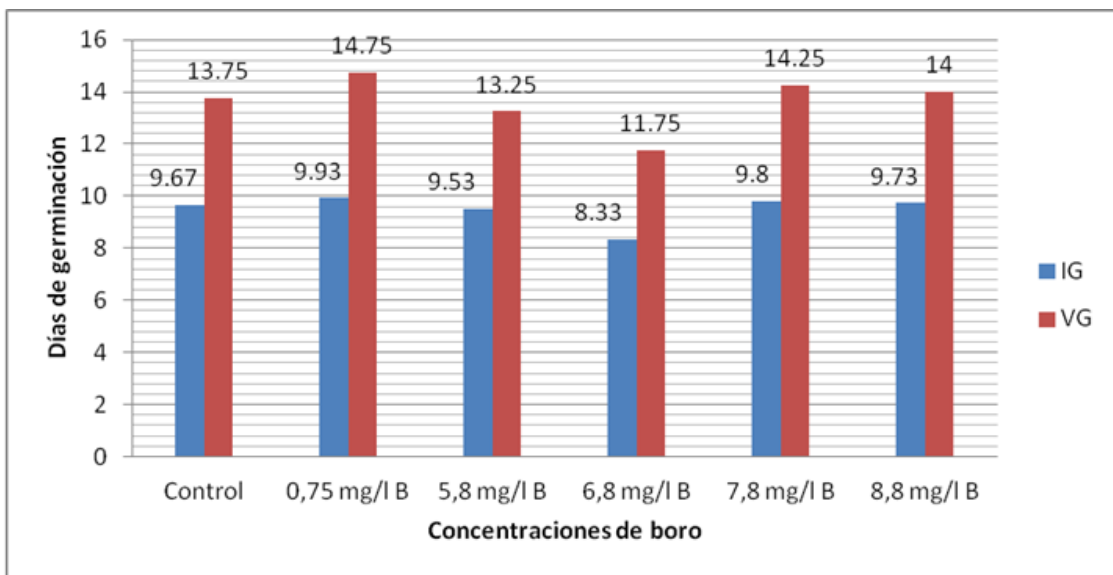
Fuente: Elaboración propia

Figura 4. Evaluación de Índice de crecimiento y velocidad de crecimiento de las semillas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de arsénico *in vitro*.

Cuadro 8. Evaluación de índice de crecimiento, índice de germinación, velocidad de crecimiento y velocidad de germinación de las semillas nativas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de boro *in vitro*.

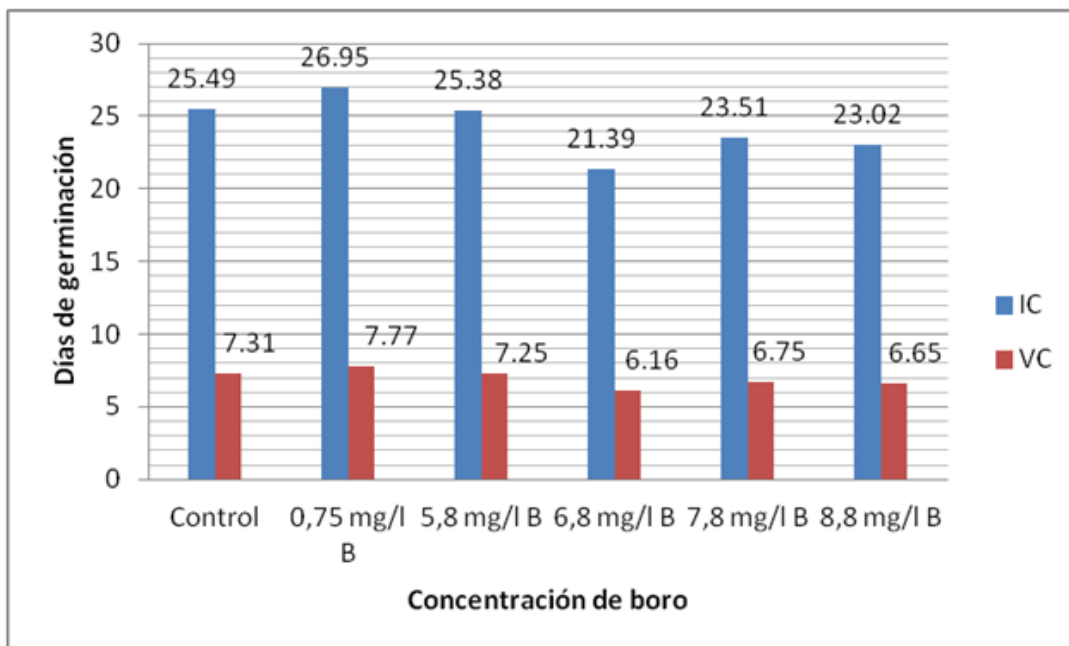
Boro				
índices	IG	VG	IC	VC
Control	9.67	13.75	25.49	7.31
5,8 mg/l B	9.53	13.25	25.38	7.25
6,8 mg/l B	8.33	11.75	21.39	6.16
7,8 mg/l B	9.80	14.25	23.51	6.75
8,8 mg/l B	9.73	14.00	23.02	6.65

Fuente: Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Figura 5. Evaluación de índice de germinación y velocidad de germinación de las semillas nativas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de boro *in vitro*.



Fuente: Elaboración propia

Figura 6. Evaluación de Índice de crecimiento y velocidad de crecimiento de las semillas nativas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de boro *in vitro*.

Cuadro 9: Coeficiente de variabilidad del tipo de emergencia de las semillas de *Medicago sativa* en concentraciones de arsénico

Arsénico		Desviación estándar	CV %
Control	Emergencia completa	1.06	81.49
	Emergencia incompleta	0.97	64.79
	No emergidos	1.03	46.95
0,15 mg/L	Emergencia completa	0.84	52.70
	Emergencia incompleta	1.48	81.98
	No emergidos	1.07	67.19
0,25 mg/L	Emergencia completa	0.97	60.38
	Emergencia incompleta	1.14	63.07
	No emergidos	1.43	89.37
0,5 mg/L	Emergencia completa	1.03	129.10
	Emergencia incompleta	1.17	83.84
	No emergidos	1.32	47.02
0,75 mg/L	Emergencia completa	1.03	86.07
	Emergencia incompleta	0.79	65.73
	No emergidos	1.07	41.34

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 10. Coeficiente de variabilidad del tipo de emergencia de las semillas de *Medicago sativa* en concentraciones de boro.

	Boro	Desviación estándar	CV %
Control	Emergencia completa	1.06	81.49
	Emergencia incompleta	0.97	64.79
	No emergidos	1.03	46.95
5,8 mg/L	Emergencia completa	0.63	79.06
	Emergencia incompleta	0.67	224.98
	No emergidos	0.88	22.45
6,8 mg/L	Emergencia completa	0.48	161.02
	Emergencia incompleta	1.16	89.19
	No emergidos	1.17	34.52
7,8 mg/L	Emergencia completa	0.84	140.55
	Emergencia incompleta	0.63	52.70
	No emergidos	1.14	35.48
8,8 mg/L	Emergencia completa	1.14	141.91
	Emergencia incompleta	0.97	60.38
	No emergidos	1.58	63.25

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 11. Análisis de varianza de densidad óptica de biomasa de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de arsénico.

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig.
Concentraciones de arsénico	4	1,5801	0,395	15,77	0,0000 **
Cepas	48	0,8057	0,0167	0,67	0,9489 NS
Error experimental	192	4,8108	0,0250		
Total	244	7,1967			

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza de la densidad óptica de biomasa nos muestra que existen diferencias estadísticas altamente significativas para las concentraciones de arsénico, por lo tanto una de las concentraciones tiene mayor efecto sobre la variable en estudio. Sin embargo entre cepas no se halló significación estadística.

Cuadro 12. Prueba de significación de Tukey para la densidad óptica de biomasa de *Sinorhizobium meliloti* a diferentes concentraciones de arsénico.

O.M.	Concentraciones	Promedio absorbancia	Significación 0,05
1	C ₃ : 0,25 mg/L de As	0,54	a
2	C ₅ : 0,75 mg/L de As	0,49	ab
3	C ₄ : 0,50 mg/L de As	0,44	bc
4	C ₂ : 0,15 mg/L de As	0,38	cd
5	C ₁ : 0,10 mg/L de As	0,32	d

Fuente: Elaboración propia

Se observa en el cuadro 23, de Tukey se observa que el mayor promedio de densidad óptica de biomasa se encontró con la concentración C₃ (0,25 mg/L de As) con 0,54 de absorbancia, en el segundo lugar se ubica C₅ (0,75 mg/L de As) con 0,49, las concentraciones de menor efecto fueron la C₂ (0,15 mg/L de As) y C₁ (0,10 mg/L de As) con 0,38 y 0,32 respectivamente.

Cuadro 13. Análisis de varianza de la densidad óptica de la biomasa de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de boro.

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig
Concentraciones de boro	3	0,239	0,079	4,55	0,045 *
Cepas	48	1,225	0,025	1,45	0,058
Error experimental	144	2,533	0,017		N.S.
Total	196	3,997			

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza del efecto de las diferentes concentraciones en boro sobre la densidad óptica de las 38 cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas señala que existen diferencias estadísticas significativas para las concentraciones de boro, por lo tanto una de las concentraciones tiene mayor efecto sobre la variable en estudio. Sin embargo entre cepas no halló significación estadística.

Cuadro 14. Prueba de significación de Tukey para la densidad óptica de biomasa de *Sinorhizobium meliloti* a diferentes concentraciones de boro.

O.M.	Concentraciones	Promedio Absorbancia	Significación 0,05
1	C ₃ : 7,8 mg/L de B	0,352	a
2	C ₄ : 8,8 mg/L de B	0,347	a
3	C ₁ : 5,8 mg/L de B	0,326	a
4	C ₂ : 6,8 mg/L de B	0,264	b

Fuente: Elaboración propia

Se observa en el cuadro de Tukey que el mayor promedio se encontró con la concentración C₃ (7,8 mg/L de B) con 0,352, en el segundo lugar se ubica C₄ (8,8 mg/L de B) con 0,347, las concentraciones de menor efecto fueron la C₁ (5,8 mg/L de B) y C₂ (6,8 mg/L de B) con 0,326 y 0,264 respectivamente.

Cuadro 15: Análisis de varianza del índice de germinación e índice de crecimiento de las semillas *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de arsénico *in vitro*

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig
Concentraciones de arsénico	5	71,698	14,339	4,80	0,0081 **
Índices	3	618,862	206,287	69,05	0,000 **
Error experimental	15	44,8129	2,987		
Total	23	735,373			

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza señala que existen diferencias altas en el efecto de las concentraciones de arsénico, es decir al menos una de las concentraciones tuvo mayor efecto sobre la variable, asimismo se evidencia diferencias altamente significativas entre los índices.

Cuadro 16. Prueba de significación de tukey para concentraciones de arsénico

O.M.	Concentraciones	Promedio	Significación 0,05
1	C ₂ : 0,15 mg/L de As	13,55	a
2	C ₄ : 0,50 mg/L de As	11,77	ab
3	C ₁ : 0,10 mg/L de As	11,16	ab
4	C ₅ : 0,75 mg/L de As	9,63	ab
5	C ₃ : 0,25 mg/L de As	9,10	b
6	C ₀ : Control	8,51	b

Fuente: Elaboración propia

Según la prueba de Tukey que el mayor promedio se encontró con la concentración C₂ (0,15 mg/L de As) con 13,55, en el segundo lugar se ubica C₄ (0,50 mg/L de As) con 11,77, las concentraciones de menor efecto fueron la C₃ (0,25 mg/L de As) con 9,10 respectivamente.

Cuadro 17: prueba de significación de tukey para los índices de germinación e índices de crecimiento

O.M.	Concentraciones	Promedio	Significación 0,05
1	V ₃ (IC)	18,79	a
2	V ₂ (VG)	10,62	b
3	V ₁ (IG)	7,75	b c
4	V ₄ (VC)	5,31	c

Fuente: Elaboración propia

El cuadro 17, de Tukey señala que el mayor promedio se halló promedio de IC con 18,79, en el segundo lugar se ubica VG con 10,62, los índices de menor promedio fueron IG y VC con 7,75 y 5,31 respectivamente.

Cuadro 18. Análisis de varianza de índice de germinación e índice de crecimiento de las semillas de *Medicago sativa* a diferentes concentraciones de boro *in vitro*

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig
Concentraciones boro	5	14,851	2,970	1,00	0,449 NS
Índices	3	848,091	282,697	95,39	0,000 **
Error experimental	15	44,452	2,963		
Total	23	907,395			

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 18, del análisis de varianza señala que no existen diferencias altas en el efecto de las concentraciones de boro, es decir tuvieron el mismo efecto sobre la variable en estudio, asimismo se evidencia diferencias altamente significativas entre los índices.

Cuadro 19: Prueba de significación de tukey para índices de germinación e índices de crecimiento

O.M.	Concentraciones	Promedio	Significación 0,05
1	V ₃ (IC)	22,62	a
2	V ₂ (VG)	13,63	b
3	V ₁ (IG)	9,50	c
4	V ₄ (VC)	6,98	c

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey señala que el mayor promedio se halló promedio de IC con 22,62, en el segundo lugar se ubica VG con 13,63, los índices de menor promedio fueron IG y VC con 9,50 y 6,98 respectivamente.

Cuadro 20. Análisis de varianza de número de semillas de *Medicago sativa* emergentes a diferentes concentraciones de arsenico

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig
A. Concentraciones de arsénico	4	0,00	0,00	0,00	1,000 NS
B. Tipo de emergencia	2	4,00	9,846	8,00	0,0005 **
Interacción AXB	8	19,44	2,430	1,970	0,0543 NS
Error experimental	135	166,2	1,2311		
Total	149	205,33			

Fuente: Elaboración propia

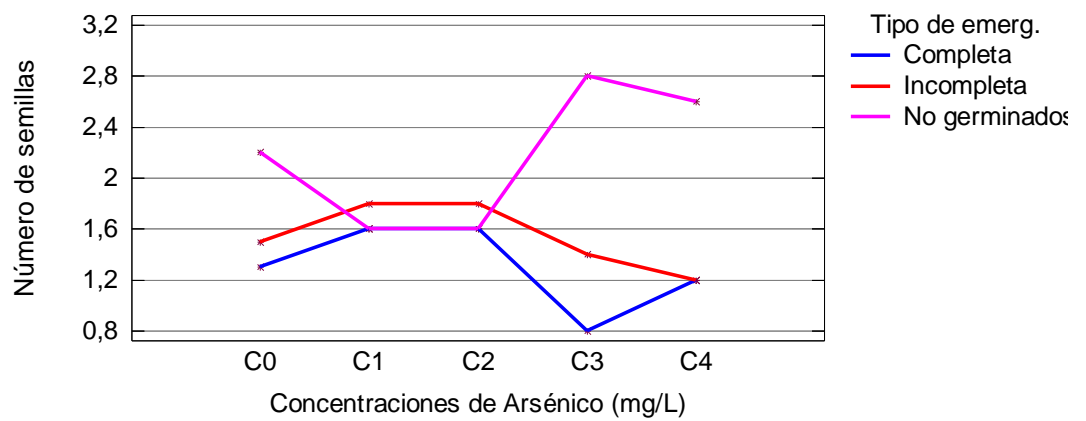
El cuadro de análisis de varianza de número de semillas señala que no existen diferencias estadísticas entre las concentraciones, es decir tuvieron el mismo efecto, sin embargo para el tipo de emergencia se hallaron diferencias altamente significativas. Por otro lado, para el factor interacción concentraciones x tipos de germinación no se encontró diferencias estadísticas lo cual señala que ambos factores actuaron independientemente.

Cuadro 21: Prueba de significación de tukey para el tipo de emergencia

O.M.	Tipo de germinación	Promedio	Significación 0,05
1	No emergidos	2,16	a
2	Emergencia Incompleta	1,54	b
3	Emergencia Completa	1,30	b

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey señala el mayor promedio en el número de semillas no emergidas con 2,16, en el segundo lugar con la emergencia incompleta con 1,54 y en el último lugar los de emergencia completa con 1,30.



Fuente: Elaboración propia

Figura 7: Interacción de concentraciones de arsénico x tipo de emergencia para el número de semillas.

La figura 7 del número de semillas muestra que la concentración C₃ (0.25 mg/L) alcanzó el mayor promedio con el número de semillas no emergidas y el menor promedio del número de semillas con emergencia completa.

Cuadro 22: Análisis de varianza del número de semillas de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de boro

Fuentes de variabilidad	G.L.	S.C	C.M.	F.C.	Sig.
A. Concentraciones de boro	4	0,026	0,0066	0,01	0,999 NS
B. Tipo de emergencia	2	147,240	73,62	74,45	0,000 **
AXB Interacción	8	34,893	4,361	4,41	0,0001 **
Error experimental	135	133,50	0,988		
Total	149	315,66			

Fuente: Elaboración propia

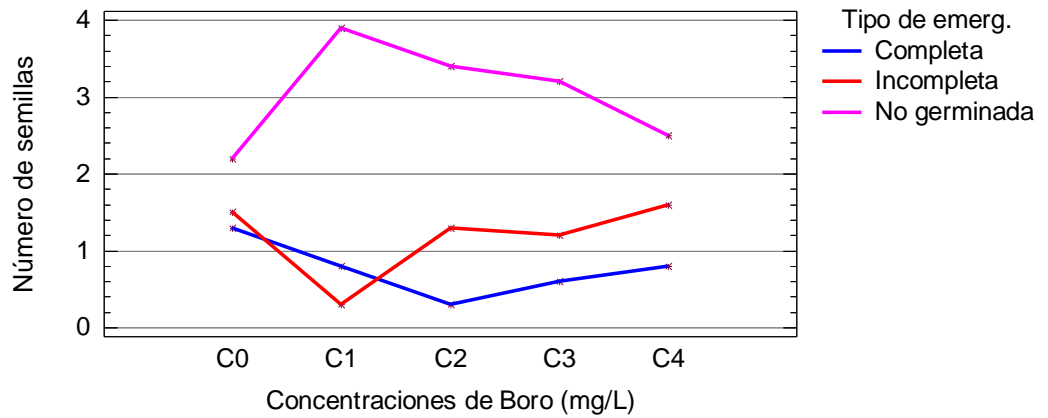
El cuadro 22 del análisis de varianza de número de semillas emergidas de *Medicago sativa* señala que no existen diferencias estadísticas entre las concentraciones boro, es decir tuvieron el mismo efecto, sin embargo para el tipo de emergencia se hallaron diferencias altamente significativas. Para el factor interacción concentraciones x tipos de germinación se encontró diferencias estadísticas altamente significativas lo cual señala que ambos factores actuaron dependientemente, uno del otro.

Cuadro 23: prueba de significación de tukey para el tipo de emergencia

O.M.	Tipo de emergencia	Promedio	Significación 0,05
1	No emergidos	3,04	a
2	Emergencia Incompleta	1,18	b
3	Emergencia Completa	0,76	b

Fuente: Elaboración propia

La prueba de Tukey señala que el mayor promedio se obtuvo en el número de semillas no emergidas con 3,04, en el segundo lugar con la germinación incompleta con 11,18 y en el último lugar con las semillas que geminaron completamente con 0,76.



Fuente: Elaboración propia

Figura 8: Interacción de concentraciones de boro x tipo de emergencia para el número de semillas

El gráfico N° 8 de numero de semillas muestra que la concentración $C_{1(5.8 \text{ mg/L})}$ alcanzó el mayor promedio con el número de semillas no germinadas, el menor promedio fue la $C_{1(5.8 \text{ mg/L})}$ con germinación incompleta.

8 DISCUSIÓN

8.1 Pruebas de pureza

De acuerdo con las pruebas de pureza realizadas, se tienen que, las cepas NA5.1 y NA6.1 dieron positivo en medio PGA – PB, sin embargo en el medio LLA ambas tuvieron una reacción negativa con el reactivo de Benedict. Lo cual es indicativo que posiblemente se trate de un contaminante, puesto que la capacidad de degradar la glucosa en el medio PGA y virar a ácido el medio no es característico de cepas de *Sinorhizobium*. En cuanto al desarrollo de las cepas en medio LLA, de un total de 69 cepas, 30 cepas tuvieron un crecimiento moderado o normal, 33 un crecimiento escaso y 6 no tuvieron crecimiento, pero todas las cepas en su totalidad dieron negativo con el reactivo de Benedict, lo que nos indica que ninguna de las cepas aisladas produce 3 - ketolactosa, la misma que es característica de *Agrobacterium*, un contaminante frecuente capaz de inducir la nodulación pero no de fijar el nitrógeno y con lo que se corrobora que posiblemente las cepas aisladas en su totalidad pertenezcan al género de *Sinorhizobium*.

Con lo que finalmente se concluye que las posibles cepas de *Sinorhizobium* con las que se trabajaron son 67 en total.

8.2 Caracterización fenotípica de *Sinorhizobium meliloti*

De las 67 cepas de *Sinorhizobium meliloti* resultantes de las pruebas de pureza, el 100% fueron Gram negativas. Las que según la medición de pH, 38 de las 67 cepas aisladas tuvieron un pH mayor a 5.5, siendo el menor valor de 5,61 (NA1.2) y el mayor de 7.15 (NA7.4), de las que un 34.21% tienen un pH de 5.59 – 6.00, un 28.95 % un pH de 6.03 – 6.53 y un 36.84 % un pH de 6.55 - 7.15. Según Cuadrado et al (2009) en la variación de pH en LMC se debe tener presente que un pH menor de 5,5, o mayor de 8 indica la presencia de microorganismos contaminantes. Identificándose así la presencia de 29 cepas como contaminantes. Al respecto Elboutahiri y Col (2010) menciona que su estudio realizado en la diversidad fenotípica y genotípica de *S. meliloti* los rizobios de alfalfa son ácidos sensibles y la mayoría de sus cepas aisladas toleraron un pH entre 5.5 – 6.0.

Las cepas aisladas tienen un promedio de crecimiento de 4.18 días, categorizando así a estas cepas como rizóbios de crecimiento rápido. De las 38 cepas aisladas, se tiene que el 15.79% creció a los 5 días, mientras que el 84.21 % creció a los 4 días.

Con respecto al tamaño de la colonia, esta es en promedio 1.12 mm en su crecimiento de placa de petri conteniendo LMA – RC en condiciones de laboratorio, siendo el mayor tamaño de colonia de 4 mm y el menor a <1 mm, el 13.16% tuvo una colonia de <1 mm de diámetro, un 68.42 % una colonia de 1 mm, un 10.53% una colonia

de 1.5 mm, un 5.26% una colonia de 2 mm y un 2.63% una colonia de 4 mm.

En cuanto a la morfología de las colonias en placa, 67 de ellas fueron opacas y grandes, 62 lisas, 41 acuosas, 36 firmes y poco gomosas, 27 gomosas muy suaves, 7 presentaron cúpula, 4 fueron translúcidas y 2 fueron pequeñas (NA7.3 y NA7.4). Por otro lado en cuanto a la producción de mucosidad un 94.74 % tuvo mucosidad regular, 2.63% poca mucosidad y un 2.63% una mucosidad abundante.

En cuanto a la caracterización de las cepas frente agentes físico – químicos sobre el crecimiento de cada cepa, se obtuvo que 51 cepas con un crecimiento normal o moderado en medio LMA con 1% de NaCl, 5 cepas tuvieron un crecimiento escaso y 1 tuvo crecimiento negativo. En medio LMA al 2% de NaCl, se obtuvo que: 32 cepas tuvieron un crecimiento escaso, 24 tuvieron un crecimiento moderado o normal y 2 tuvieron un crecimiento negativo. Por lo tanto el 89,47 % de las cepas muestra un crecimiento normal o moderado en presencia de NaCl al 1%, y el 42,10 % tuvieron un crecimiento normal o moderado en presencia de NaCl al 2%. Con lo que se concluye que las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas en su mayoría son tolerantes a concentraciones de NaCl al 1%, pero disminuye un 47.37% en su crecimiento al ser expuestas a concentraciones de NaCl al 2%. Resultados que según Elboutahiri y Col (2010) nos indican que la salinidad es un factor de estrés importante para los rizóbios porque inhibe su persistencia y

desarrollo, pero consecuentemente, una selección de cepas de rizobios tolerantes a la salinidad es de gran importancia para el cultivo de alfalfa en áreas afectadas por la salinidad.

Por otro lado en cuanto a la evaluación de las cepas aisladas y su evaluación de crecimiento a diferentes temperaturas, se obtuvo que, frente a la incubación a 4°C, 36 cepas tuvieron un crecimiento escaso, 12 no tuvieron crecimiento a esta temperatura y 10 tuvieron un crecimiento normal o moderado, 54 cepas tuvieron un crecimiento normal a 28°C, y ninguna cepa tuvo un crecimiento a 42°C. Con lo que se concluye que el 66,66% de las cepas tiene poca tolerancia al crecimiento a 4°C, por su escaso crecimiento y tan sólo un 18.51% tuvo un crecimiento normal a bajas temperaturas, al mismo tiempo que se demostró que todas las cepas aisladas son intolerantes a las temperaturas superiores a 30°C (temperatura normal y óptima para su crecimiento).

8.3 Evaluación de *Sinorhizobium meliloti* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*

De acuerdo con el análisis de varianza realizado a la evaluación de densidad óptica de biomasa microbiana sometida a diferentes concentraciones de arsénico, se deduce que existen diferencias significativas para las concentraciones de arsénico usadas (0,1 mg/L, 0,15 mg/L, 0,25mg/L, 0,5 mg/L y 0,75 mg/L), mas no para las cepas aisladas, con lo cual se presume que una de las

concentraciones afecta en mayor proporción a las cepas en general. Se comprueba de esta manera que existe una influencia del arsénico sobre el crecimiento microbiano de *Sinorhizobium meliloti* en las pruebas experimentales realizadas.

Al aplicar la prueba de tukey para determinar con cual de las concentraciones se obtuvo mayor densidad microbiana, se determino que: la concentración de 0.25 mg/L de arsénico, presento mayor densidad óptica con una absorbancia de 0.540, siendo la menor concentración de arsénico con la que se obtuvo el menor valor de absorbancia 0.320, y la concentración más alta de 0.49, lo que nos da indicios de una cierta necesidad de arsénico de la bacteria para desarrollar y al mismo tiempo una tolerancia desarrollada probablemente producto de la adaptación de la bacteria de este metal a su crecimiento por un periodo prolongado.

En cuanto a la evaluación del crecimiento de cepas de *Sinorhizobium meliloti* en medio LMC con diferentes concentraciones de boro, según el análisis estadístico, señala que existe diferencias significativas para las concentraciones de boro y al igual que la experimentación para el arsénico, no se observaron diferencias significativas para las cepas en estudio, encontrándose el mayor promedio de densidad óptica de biomasa para la concentración de 7.8 mg/L(0.352).

Según Vasilica y Col (2011), donde evaluó distintos metales pesados en cepas de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* cita que la

contaminación con varios metales pesados no afectan directamente a los nódulos, mientras que el pH tiene efectos más importantes. Además, aunque los efectos de los metales pesados tienen un claro impacto negativo en las poblaciones de las bacterias del suelo, sus resultados mostraron que se obtuvo poco efecto sobre el número de UFC pero que la diversidad se vio afectada.

De acuerdo a lo mencionado líneas arriba, se puede inferir que probablemente la diversidad microbiana este siendo afectada por las concentraciones de arsénico y boro, las que sobrepasan los límites establecidos para agua usadas para riego, habiendo evidenciado en el presente trabajo el alto número de cepas contaminantes (31) con respecto al total de cepas aisladas (69).

8.4 Evaluación de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de arsénico y boro *in vitro*

Para el caso del arsénico, se obtuvo según el análisis de varianza señala que existen diferencias altas en el efecto de las concentraciones de arsénico, es decir al menos una de las concentraciones tuvo mayor efecto sobre la variable, así mismo se evidencia diferencias altamente significativas entre los índices, que según la prueba de Tukey el mayor promedio se encontró con la concentración 0.15 mg/L As con 13,55, las concentraciones de menor efecto fueron la 0.25 mg/L con 9,10 en cuanto al número de semillas germinadas. Para la evaluación del número de semillas emergidas se obtuvo que no existe diferencia significativas, es decir

todas las concentraciones de arsénico tuvieron el mismo efecto sobre las semillas de *Medicago sativa*, pero a su vez se vio una diferencia en el tipo de emergencia, siendo mayor el número de semillas no emergidas y menor el número de semillas con emergencia completa en la concentración de 0.25 mg/L.

Para el caso del boro, según el análisis de varianza señala que no existen diferencias altas en el efecto de las concentraciones de boro, es decir tuvieron el mismo efecto sobre la variable en estudio, en la mayoría de las concentraciones de boro se obtuvo mayor número de semillas no emergidas con 3.04 y menor número de semillas con emergencia incompleta con 11.18.

9 CONCLUSIONES

- Para *Medicago sativa* el mayor índice de germinación fue a 0.15 mg/L As, por otro lado el número de semillas no emergidas en 0.25 mg/L As es mayor. Para el caso del B influye de la misma forma en todas las concentraciones (5.8 mg/L, 6.8 mg/L, 7.8 mg/L, 8.8 mg/L), siendo en todas ellas mayor el número de semillas no emergidas. Para las cepas *Sinorhizobium meliloti* aisladas todas crecieron en todas las concentraciones de As y B probadas. Por lo tanto, se concluye que la fijación de nitrógeno se vería afectada en el desarrollo de *Medicago sativa*, como parte esencial para la fijación de nitrógeno, en presencia del boro en las concentraciones probadas y en concentraciones que superen los 0.15 mg/L de As.
- Se aisló 38 cepas de *Sinorhizobium meliloti*, las que son de crecimiento rápido (4 días), con un diámetro aprox de 1 mm, con mucosidad regular, con un pH de 6.55 – 7.15, con las características morfológicas de colonia: lisa, opaca, acuosa y grande.
- Las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas presentan una mayor densidad óptica (0.540) en las concentraciones de 0.25 mg/L de As y la menor densidad óptica (0.320) en la concentración de 0.10 mg/L de As. Para el caso del boro la mayor densidad óptica (0.352) se dio en la concentración de 7.8 mg/L de B (0.264) y la menor en la concentración de 6.8 mg/L de B.

- Se determinó que en la concentración de 0.15 mg/L de As se obtuvo mayor índice de germinación (13.55) mientras que el menor índice de germinación (9.10) y mayor número de semillas no emergidas se obtuvo en la concentración de 0.25 mg/L de As. Para el caso del boro, no se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones (5.8 mg/L, 6.8 mg/L, 7.8 mg/L, 8.8 mg/L) dando como resultado un mayor número de semillas de *Medicago sativa* no emergidas en todas las concentraciones ensayadas.
- Se relacionó que a mayor concentración de arsénico disminuyen los índices de germinación y aumentaron el número de semillas no emergidas. Para el caso de las concentraciones de boro, las cepas aisladas toleran con buen crecimiento a concentraciones de 7.8 mg/L de B y no afectaron los índices de germinación de las semillas de *Medicago sativa* pero si aumentaron el número de semillas no emergidas.

10 RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación para determinar las concentraciones de arsénico, boro y nitrógeno en el suelo agrícola.
- Implementar investigaciones sobre la bioacumulación de metales en los cultivos de importancia económica en las zonas que utilicen como agua de riego provenientes del río Locumba.
- Reemplazar el sistema de irrigación por inundación por otras tecnologías de riego.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aparecida de Souza, R., 2008. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. Rev. Pesq. Agropec. Bras. Vol 43. Nº 1. Brasil.

Araldi Brandoli, Marcelo A., 2009. Utilização de marcadores morfológicos para a seleção precoce de alfalfa com aptidão ao pastejo e avaliação da fixação biológica de nitrogênio. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.

Arantes Felipe, R.T., 2007. Crescimento e respostas antioxidativas em espécies leguminosas submetidas ao arsênio. Dissertação. Universidade Federal de Vicosa. Minas Gerais, Brasil.

Ardakani, M. R., 2009. Nitrogen Fixation and yield of lucerne (*Medicago sativa* L.), as affected by Co inoculation with *Sinorhizobium meliloti* and Arbuscular Mycorrhiza under Dry Organic Farming Conditions. American – Eurasian Journal. Agric. & Environ. Sci., 6(2): 173 – 183. Austria.

Artexte, U, J. García, M. Duñabeitia, 1999. Selección de cepas de *Rhizobium* tolerantes a metales pesados para programas de revegetación. XIII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Universidad de Sevilla, Fundación El Monte, pág 269, España.

Baca, B., L. Soto, M. Pardo, 2000. Fijación Biológica de nitrogênio, Rev. Elementos Vol 38, pp 43 – 49

Barba, L., 2002. Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición. Universidad del Valle. Santiago de Cali.

Bazzigalupi, O., S. Pistorale, A. Andrés, 2008. Tolerancia a La salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). Artículo de investigación Rev. Ciencia e Investigación Agraria 35(3): 277 – 285.

Bécquer, C.J., 2004. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. Revista Biología Vol. 18 N°. 1. Cuba.

Bolaños, L., 1994. Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) *Rhizobium* nodules. Rev. Plant Physiology. Vol 110 N°4. España.

Bonilla , I., 1996. Esencialidad del boro en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium* – leguminosa. Universidad Autónoma de Madrid. España.

Carbonell B., A., E. Burló Carbonell, J. Mataix Beneyto, 1995. Arsénico en el sistema suelo – planta Significado ambiental. Espagrafic. Universidad de Alicante. España.

Carbonell, A., 1997. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plant. Rev. Scientia horticulturae. Vol. 71. N°4. España.

Carrasco, J., 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcóllar pyrite mine. *Soil biology & biochemistry*. Vol. 37. N°6. España.

Cuadrado, B., G. Rubio, W. Santos, 2009. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmaceuticas*. Vol 38 (1), 78 – 104. Cartagena, Colombia.

D'Atellis, R., 2005. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Producción de semilla Tinogatsa, Catamarca. Dirección Provincial de Programación del Desarrollo del Ministerio de Producción y Desarrollo del Gobierno de la Provincia de Catamarca, pág. 4, Argentina.

Dirección Regional Agraria, 2011. Síntesis Agraria. Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna, Dirección de estadística Agraria. Tacna – Perú.

Elboutahiri, N, Thami-Alami, I., Udupa, S., 2010. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco.

El – Hamdaoui, A., 2003. Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum* – pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Journal Plant, cell and environment*. Vol 26, N° 7. España.

El-Hamdaoui, 2003. Salinidad: Efectos del estrés salino sobre la fijación de nitrógeno en leguminosas.

Gurich, N., J. González, 2009. Role of Quorum sensing in sinorhizobium meliloti – Alfalfa symbiosis. *Journal of Bacteriology*. Vol. 191, N^a 13, p. 4372 – 4382.

Hristozkova, M., M. Geneva, I. Stancheva, 2008. Effects of Sinorhizobium meliloti strains (1021 and NitR) on nitrogen assimilation of alfalfa plants under conditions of mineral elements shortage. *Gen. Appl. Plant Physiology*, Special Issue 34 (3-4), 327-338. Bulgaria.

Isea, D., N. Bello, L. Vargas, 2005. Estudio de la acumulación de metales micronutrientes en suelos sometidos a riego con aguas residuales tratadas.

Juárez, H., 2006. Contaminación del río Rímac por metales pesados y efecto en la agricultura en el cono de Lima Metropolitana. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.

Lloret, L., 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* Vol 47. España.

Lluch, C., 2007. Tolerancia al estrés salino en leguminosas. *Lotus Newsletter*. Vol 37 (2). España.

Lukaszewski, K., 1996. Root growth inhibition in boron – deficient or aluminum – stressed squash may be a result of impaired ascorbate metabolism. *Plant physiology*. Vol. 112 N^o3. Columbia.

Mahtab S., S. Foroozan, P. Kazem, 2008. The effect of salinity on the nitrogen fixation in 4 cultivars of *Medicago sativa* L. in the seedling emergence stage. *Journal of Agriculture and biological sciences*, Vol 4 N°5: 413 – 415. Iran.

Mandal, S., 2008. Characterization of a symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic: Isolated from the root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper grown in an arsenic – contaminated field. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, Vol 54. India.

Min Yan, A., E. Tao Wang, F. Ling Kan, Z. Yuan Tan, 2000. Sinorhizobium meliloti associated with *Medicago sativa* and *Melilotus* spp. In arid saline soils in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1887 – 1891. Print Gran Britain.

Moreira M., L., J. D. Becker, A. Becker, 2000. The sinorhizobium meliloti ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology* 146: 2237 – 2248. Germany.

Municipalidad Provincial Jorge Basadre Grohmann, 2008. Mejoramiento de las capacidades competitivas de los principales cultivos del valle de Locumba.

Navarro, J., I. Aguilar, J. López, 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente Ecosistemas*, Vol. 16 (2) Págs. 10-25. Valencia.

Ogutcu, H., 2008. The determination of symbiotic effectiveness of *Rhizobium* strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in *Erzurum*. Turk J Agric. Turkey.

Pajuelo, E., 2008. Toxic effects of arsenic on *Sinorhizobium – Medicago sativa* symbiotic interaction. Vol. 154, N° 2. España.

Prieto, F., 2007. Acumulación de arsénico en el cultivo de habas (*Vicia faba*). Agronomía Costarricense 31(2). Costa Rica.

Prieto García, F., J. Prieto Mendez, A. Román Gutierrez, 2010. Bioacumulación de Arsénico en las etapas de desarrollo de La cebada maltera (*Hordeum distichon L.*). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol. 1 Num. 1 p. 37 – 44. Hidalgo, México.

Quiñonez, A., D. Fontana, A. Mollo, 2003. Respuesta de la alfalfa al agregado de fósforo, boro y calcio. Revista FAVE – Ciencias Agrarias Vol. 2 (1-2). Santa Fé, Argentina.

Ratto de Miguez, S., Z. de Sesé, H. Canelo, 1984. Estudio del contenido de boro en suelos y aguas de la provincia de la Rioja mediante el uso de Azometina – H. Ciencia del Suelo, Vol 2, N°1. Argentina.

Real, D., 2002. Estado actual y futuro de la producción y utilización de leguminosas forrajeras en la zona campos. INIA. Uruguay.

Redondo, M., 2001. Boron deficiency affects early infection events in the pea – *rhizobium* symbiotic interaction. Australian journal of plant physiology. Vol. 28, N° 8. España.

Redondo, M., 2002. Efecto de la relación de B- Ca²⁺ en la simbiosis *Rhizobium* – leguminosas. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis. España.

Redondo, M., 2003. Relationship between boron and calcium in the N₂-fixing legume – rhizobia symbiosis. *Plant, cell & environment*, Vol 26, N° 11. España.

Reichman, S., 2007. The potencial use of the legume – *Rhizobium* symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology*. Vol 39. New Zealand.

Soto, P., E. Jahn, I. Maldonado, N. Rodriguez, 2000. Recuperación de una pradera de alfalfa (*Medicago sativa* L.) mediante fertilización en diferentes condiciones de nivel freático en el suelo. *Agricultura Técnica* Vol. 60 N.3. Santiago, Chile.

Suárez, P. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Rev. Interciencia*. Vol. 27 N°4. Caracas.

Vasilica, S., Gament, E., Cornea, C., Voaides C., Dusa, M., Plopeanu, G., 2011. Effects of heavy metal from polluted soils on the *Rhizobium* diversity. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*. Vol 39, N° 1 (88 - 95). Romania.

Valanze de Medeiros, E., K. Pereira Silva, C. Miranda Martins, W. Lustrino Borges, 2007. Tolerancia de bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de municipios do Rio Grande do Norte á temperatura e salinidade. *Revista de Biologia e ciências da terra* Vol 7 N°2. Brasil.

Vassoler S.R., 2008. Caracterizacáo química e estrutural de exopolisacarídeos e lipopolisacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. Dissertacáo de tesse. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Brasil.

Villar – Igea, M., E. Velazquez, R. Rivas, A. Willems, 2007. Phosphate solubilizing rhizobia originating from *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonella* grown in a Spanish soil. Ed. Springer, First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, 149 – 156, España.

Yang, H., J. Cheng, T. Finan, 2005. Novel Pathway for Arsenic Detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*. Vol. 187. N^a. 20, p. 6991 – 6997.

Yakubu, H., J. Kwari, J. Tekwa, 2010. Nodulation and N₂ fixation grain legumes as affected by roron fertilizer in sudano – sahelian zone of north – eastern Nigeria. *American Eusasian J. Agric. & Environ. Sci.* Vol 8, N^o 5: 514-519. Nigeria.

Zhao, 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere*. Vol. 70 N^o8. Chine.

12 ANEXOS

Cuadro 24: Relación de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas y su reacción en las pruebas de pureza

N°	Cod. Cepa	Crec. en PGA-PB	Crec. en LLA	Reacción LLA
1	UJB1.1	-	++	-
2	UJB 1.2	-	+	-
3	UJB2	-	+	-
4	UJB3.1	-	+	-
5	UJB3.2	-	+	-
6	UJB3.3	-	+	-
7	UJB4.1	-	+	-
8	UJB4.2	-	+	-
9	UJB5	-	+	-
10	UJB5.1	+	-	-
11	UJB6.1	+	+	-
12	UJB6.2	-	+	-
13	UJB7.1	-	++	-
14	UJB7.2	-	++	-
15	UJB7.3	-	++	-
16	UJB7.4	-	+	-
17	UJB8	-	+	-
18	UJB9.1	-	+	-
19	UJB9.2	-	+	-
20	UJB9.3	-	+	-

Leyenda: (-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado o normal.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 25: Relación de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas y su reacción en las pruebas de pureza (Continuación)

Nº	Cod. Cepa	Crec. en PGA-PB	Crec. en LLA	Reacción LLA
21	UJB9.4	-	+	-
22	UJB9.5	-	-	-
23	UJB9.6	-	-	-
24	UJB9.7	-	-	-
25	UJB9.8	-	-	-
26	UJB9.9	-	-	-
27	UJB9.10	-	+	-
28	UJB10.1	-	++	-
29	UJB10.2	-	++	-
30	UJB10.3	-	++	-
31	UJB10.4	-	++	-
32	UJB11.1	-	++	-
33	UJB11.2	-	++	-
34	UJB13.1	-	+	-
35	UJB14.1	-	+	-
36	UJB14.2	-	++	-
37	UJB14.3	-	++	-
38	UJB15	-	+	-
39	UJB16.2	-	+	-
40	UJB17.1	-	++	-

Leyenda: (-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado o normal.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 26: Relación de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas y su reacción en las pruebas de pureza (Continuación)

N°	Cod. Cepa	Crec. en PGA-PB	Crec. en LLA	Reacción LLA
41	UJB17.1	-	+	-
42	UJB18.1	-	++	-
43	UJB19.3	-	+	-
44	UJB20.1	-	++	-
45	UJB20.2	-	+	-
46	UJB21.1	-	++	-
47	UJB21.4	-	+	-
48	UJB21.6	-	+	-
49	UJB22	-	+	-
50	UJB23.1	-	++	-
51	UJB23.2	-	++	-
52	UJB23.3	-	++	-
53	UJB24.1	-	+	-
54	UJB24.2	-	++	-
55	UJB25.1	-	++	-
56	UJB25.2	-	+	-
57	UJB25.3	-	+	-
58	UJB25.4	-	++	-
59	UJB27.1	-	+	-
60	UJB27.2	-	++	-

Leyenda: (-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado o normal.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 27: Relación de las características morfológicas de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas

N°	Cod. Cepa	Coloración Gram	Velocidad Crecimiento (días)	Diámetro (mm)	Morfología de la colonia *	Mucosidad	Reacción LMA – ABT**	pH	Autenticación
1	UJB1.1	negativo	5	1.5	li,o, f,a,g	regular	amarillo	5,86	Nod (+)
2	UJB1.2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Regular	verde	6,67	Nod (+)
3	UJB2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Regular	amarillo	5,61	Nod (+)
4	UJB3.1	negativo	4	2	li,o, f,a,g	Regular	verde	6,94	Nod (+)
5	UJB3.2	negativo	4	2	li,o, f,a,g	Regular	verde	5,86	Nod (+)
6	UJB3.3	negativo	5	< 1	li,o, f,a,g	Regular	verde	6,68	Nod (+)
7	UJB4.1	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Regular	amarillo	5,91	Nod (+)
8	UJB4.2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Regular	amarillo	6,00	Nod (+)
9	UJB5	negativo	3	1	li,o, f,a,g	Regular	verde	4,89	-
10	UJB6.2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Regular	amarillo	6,19	Nod (+)
11	UJB7.1	negativo	4	4	li,o,go,g	Regular	amarillo	5,62	Nod (+)
12	UJB7.2	negativo	4	2,5	li,o,go,g	Regular	amarillo	5,25	-

* c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande.

**Reacción: ácido: amarillo, verde: neutro, azul: alcalino. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 28: Relación de las características morfológicas de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas (Continuación)

	Cod. Cepa	Coloración Gram	Velocidad Crecimiento (días)	Diámetro (mm)	Morfología de la colonia *	Mucosidad	Reacción LMA – ABT**	pH	Autenticación
13	UJB7.3	negativo	4	1	li,o,go,g	regular	amarillo	5,25	-
14	UJB7.4	negativo	4	1,5	li, t, f,a,p	regular	amarillo	5,34	-
15	UJB8	negativo	5	1	li, t, f,a,p	regular	verde azulado	7,15	Nod (+)
16	UJB9.1	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	6,22	Nod (+)
17	UJB9.2	negativo	4	1	li,o,go,g	regular	amarillo	6,44	Nod (+)
18	UJB9.3	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,65	Nod (+)
19	UJB9.4	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,18	Nod (+)
20	UJB9.5	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,55	Nod (+)
21	UJB9.6	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,79	Nod (+)
22	UJB9.7	negativo	4	1	li,o, go,a,g	abundante	amarillo	6,87	Nod (+)
23	UJB9.8	negativo	5	1,5	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,73	Nod (+)
24	UJB9.9	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,65	Nod (+)
25	UJB9.10	negativo	4	1,5	li, t, f, g,a,o	regular	amarillo	6,55	Nod (+)
26	UJB10.1	negativo	4	< 1	cu,o,go,g	regular	amarillo	5,33	-

* c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande.

**Reacción: ácido: amarillo, verde: neutro, azul: alcalino. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 29: Relación de las características morfológicas de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas (Continuación)

	Cod. Cepa	Coloración Gram	Velocidad Crecimiento (días)	Diámetro (mm)	Morfología de la colonia *	Mucosidad	Reacción LMA – ABT**	pH	Autenticación
27	UJB10.2	negativo	4	1	cu,o,go,g	Poca	amarillo	5,23	-
28	UJB10.3	negativo	4	<1	cu,o,go,g	regular	amarillo	5,25	-
29	UJB10.4	negativo	4	1	cu,o,go,g	regular	amarillo	5,24	-
30	UJB11.1	negativo	4	1,5	li,o,f,g	regular	amarillo	6,35	Nod (+)
31	UJB11.2	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,25	-
32	UJB13.1	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,63	Nod (+)
33	UJB14.1	negativo	4	1	li,o, f,a,g	regular	amarillo	6,63	Nod (+)
34	UJB14.2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	regular	amarillo	5,84	Nod (+)
35	UJB14.3	negativo	4	1,5	li,o, go,a,g	regular	amarillo	5,25	-
36	UJB15	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,07	Nod (+)
37	UJB16.2	negativo	4	1	li, t, f, g,a,o	regular	amarillo	6,14	Nod (+)
38	UJB17.1	negativo	4	<1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	6,49	Nod (+)
39	UJB17.2	negativo	4	<1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	5,89	Nod (+)
40	UJB18.1	negativo	4	<1	li,o,go,g	regular	amarillo	6,53	Nod (+)

* c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande.

**Reacción: ácido: amarillo, verde: neutro, azul: alcalino. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 30: Relación de las características morfológicas de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas (Continuación)

N°	Cod. Cepa	Coloración Gram	Velocidad Crecimiento (días)	Diámetro (mm)	Morfología de la colonia *	Mucosidad	Reacción LMA – ABT**	pH	Autenticación
41	UJB19.3	negativo	4	1	li,o,go,g	regular	amarillo	6,24	Nod (+)
42	UJB20.1	negativo	5	1	li,o,a,g	Poca	amarillo	5,33	-
43	UJB20.2	negativo	4	1	li,o,a,g	regular	amarillo	6,03	Nod (+)
44	UJB21.1	negativo	4	1	li,o,a,g	regular	amarillo	5,27	-
45	UJB21.4	negativo	4	1	li,o,a,g	regular	verde	6,82	Nod (+)
46	UJB21.6	negativo	4	1	li,o,a,g	regular	verde	5,78	Nod (+)
47	UJB22	negativo	4	1	li,o,a,g	regular	amarillo	5,91	Nod (+)
48	UJB23.1	negativo	4	1	li,o, f,a,g	Poca	amarillo	5,31	-
49	UJB23.2	negativo	4	1	li,o, f,a,g	regular	amarillo	5,24	-
50	UJB23.3	negativo	5	1	li,o, f,a,g	regular	amarillo	5,40	-
51	UJB24.1	negativo	5	1	cu,o,go,g	Poca	amarillo	5,06	-
52	UJB24.2	negativo	5	1	cu,o,go,g	Poca	verde amarillo	7,04	Nod (+)
53	UJB25.1	negativo	4	1	li,o, go,a,g	regular	verde amarillo	6,63	Nod (+)
54	UJB25.2	negativo	4	<1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	5,32	-

* c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande.

**Reacción: ácido: amarillo, verde: neutro, azul: alcalino. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 31: Relación de las características morfológicas de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas (Continuación)

N°	Cod. Cepa	Coloración Gram	Velocidad Crecimiento (días)	Diámetro (mm)	Morfología de la colonia *	Mucosidad	Reacción LMA – ABT**	pH	Autenticación
55	UJB25.3	negativo	4	2	li,o, go,a,g	regular	amarillo	5,26	-
56	UJB25.4	negativo	6	1	li,o, go,a,g	regular	amarillo	5,29	-
57	UJB27.1	negativo	4	<1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,37	-
58	UJB27.2	negativo	5	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,37	-
59	UJB27.3	negativo	5	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,28	-
60	UJB28.2	negativo	4	1,5	cu,o,go,g	abundante	amarillo	5,40	-
61	UJB29.1	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,42	-
62	UJB29.2	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,15	-
63	UJB29.3	negativo	5	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,37	-
64	UJB30.1	negativo	5	1,5	li,o,f,g	regular	amarillo	5,26	-
65	UJB 30.2	negativo	5	< 1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,59	Nod (+)
66	UJB30.3	negativo	4	1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,33	-
67	UJB30.4	negativo	5	< 1	li,o,f,g	regular	amarillo	5,36	-

* c: cúpula, li: lisa o llana, o: opaca, t: translúcida, f: firme poco gomosa, go: gomosa muy suave, a: acuosa, p: pequeña, g: grande.

**Reacción: ácido: amarillo, verde: neutro, azul: alcalino. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 32: Relación de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas y su crecimiento con agentes físico químicos

N°	Cod. Cepa	NaCl		T°		
		1%	2%	4°C	28°C	42°C
1	UJB1.1	++	++	+	+++	-
2	UJB1.2	++	++	+	+++	-
3	UJB.2	+	+	-	+++	-
4	UJB3.1	+	+	-	+++	-
5	UJB3.2	++	+	-	+++	-
6	UJB3.3	++	+	+	+++	-
7	UJB4.1	++	+	+	+++	-
8	UJB4.2	++	+	-	+++	-
9	UJB6.2	++	+	-	+++	-
10	UJB7.1	++	+	-	+++	-
11	UJB8	++	+	+	+++	-
12	UJB9.1	+	+	+	+++	-
13	UJB9.2	-	-	+	+++	-
14	UJB9.3	+	++	+	+++	-
15	UJB9.4	++	+	-	+++	-
16	UJB9.5	++	+	+	+++	-
17	UJB9.6	++	+	+	+++	-
18	UJB9.7	++	+	+	+++	-
19	UJB9.8	++	-	+	+++	-
20	UJB9.9	++	+	+	+++	-

Leyenda: (-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado o normal.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 33: Relación de cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas y su crecimiento con agentes físico químicos. (Continuación)

N°	Cod. Cepa	NaCl		T°		
		1%	2%	4°C	28°C	42°C
21	UJB9.10	++	+	+	+++	-
22	UJB11.1	++	++	+	+++	-
23	UJB13.1	++	++	+	++	-
24	UJB14.1	++	++	+	+++	-
25	UJB14.2	++	++	++	+++	-
26	UJB.15	++	+	+	+++	-
27	UJB16.2	++	+	+	+++	-
28	UJB17.1	++	++	+	+++	-
29	UJB17.2	++	++	+	+++	-
30	UJB18.1	++	++	++	+++	-
31	UJB19.3	++	+	+	+++	-
32	UJB20.2	++	++	++	+++	-
33	UJB21.4	++	++	++	+++	-
34	UJB21.6	++	+	-	+++	-
35	UJB22	++	+	-	+++	-
36	UJB24.2	++	++	++	++	-
37	UJB25.1	++	+	++	+++	-
38	UJB30.2	++	+	-	+++	-

Leyenda: (-) no hay crecimiento, (+) crecimiento escaso, (++) crecimiento moderado o normal.

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 34: Densidad óptica de biomasa de *Sinorhizobium meliloti* sometida a diferentes concentraciones de arsénico.

Arsénico						
	COD. CEPA	0,1 mg/L	0,15 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L	0,75 mg/L
1	UJB1.1	0.214	0.373	0.627	0.458	0.310
2	UJB1.2	0.251	0.245	0.667	0.433	0.684
3	UJB2	0.16	0.332	0.501	0.435	0.773
4	UJB3.1	0.244	0.455	0.469	0.670	0.644
5	UJB3.2	0.26	0.473	0.771	0.754	0.690
6	UJB3.3	0.342	0.420	0.564	0.459	0.799
7	UJB4.1	0.282	0.169	0.513	0.213	0.795
8	UJB4.2	0.42	0.420	0.614	0.260	0.522
9	UJB6.2	0.308	0.323	0.552	0.607	0.330
10	UJB7.1	0.267	0.149	0.444	0.473	0.901
11	UJB8	0.200	0.175	0.587	0.503	0.332
12	UJB9.1	0.288	0.372	0.561	0.338	0.856
13	UJB9.2	0.244	0.338	0.348	0.347	0.696
14	UJB9.3	0.242	0.533	0.638	0.523	0.935
15	UJB9.4	0.203	0.423	0.479	0.313	0.878
16	UJB9.5	0.295	0.375	0.439	0.440	0.789
17	UJB9.6	0.211	0.218	0.566	0.282	0.519
18	UJB9.7	0.410	0.325	0.596	0.348	0.359
19	UJB9.8	0.210	0.307	0.624	0.420	0.587
20	UJB9.9	0.237	0.252	0.421	0.308	1.103

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 35: Densidad óptica de biomasa de *Sinorhizobium meliloti* sometida a diferentes concentraciones de arsénico. (Continuación)

		Arsénico				
	COD. CEPA	0,1 mg/L	0,15 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L	0,75 mg/L
21	UJB9.1	0.324	0.246	0.567	0.501	0.368
22	UJB11.1	0.405	0.146	0.508	0.739	0.491
23	UJB13.1	0.323	0.450	0.616	0.301	0.683
24	UJB14.1	0.286	0.317	0.438	0.498	0.467
25	UJB14.2	0.265	0.198	0.440	0.809	0.622
26	UJB15	0.340	0.287	0.509	0.630	0.502
27	UJB16.2	0.368	0.610	0.532	0.598	0.328
28	UJB17.1	0.394	0.495	0.485	0.523	0.172
29	UJB17.2	0.388	0.729	0.781	0.385	0.271
30	UJB18.1	0.478	0.340	0.683	0.518	0.572
31	UJB19.3	0.421	0.419	0.522	0.481	0.260
32	UJB20.2	0.357	0.293	0.563	0.399	0.373
33	UJB21.4	0.414	0.523	0.657	0.436	0.258
34	UJB21.6	0.386	0.497	0.392	0.320	0.122
35	UJB22	0.389	0.482	0.609	0.241	0.220
36	UJB24.2	0.359	0.480	0.558	0.250	0.188
37	UJB25.1	0.481	0.547	0.419	0.483	0.139
38	UJB30.2	0.345	0.517	0.439	0.526	0.368

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 36: Efecto de diferentes concentraciones de boro en la densidad óptica de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas

		Boro			
	COD. CEPA	5.8 mg/L	6.8 mg/L	7.8 mg/L	8.8 mg/L
1	UJB1.1	0.281	0.244	0.479	0.479
2	UJB1.2	0.537	0.226	0.386	0.334
3	UJB2	0.548	0.293	0.544	0.334
4	UJB3.1	0.790	0.255	0.212	0.380
5	UJB3.2	0.765	0.292	0.488	0.425
6	UJB3.3	0.469	0.204	0.120	0.258
7	UJB4.1	0.202	0.514	0.570	0.292
8	UJB4.2	0.163	0.261	0.310	0.281
9	UJB6.2	0.068	0.233	0.115	0.321
10	UJB7.1	0.315	0.217	0.346	0.331
11	UJB8	0.138	0.231	0.484	0.233
12	UJB9.1	0.252	0.219	0.044	0.279
13	UJB9.2	0.189	0.236	0.212	0.309
14	UJB9.3	0.223	0.231	0.423	0.495
15	UJB9.4	0.017	0.423	0.420	0.247
16	UJB9.5	0.201	0.452	0.599	0.400
17	UJB9.6	0.397	0.168	0.069	0.339
18	UJB9.7	0.140	0.207	0.145	0.342
19	UJB9.8	0.428	0.318	0.313	0.338
20	UJB9.9	0.346	0.260	0.447	0.345

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 37. Efecto de diferentes concentraciones de boro en la densidad óptica de las cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas. (Continuación)

		Boro			
	COD. CEPA	5.8 mg/L	6.8 mg/L	7.8 mg/L	8.8 mg/L
21	UJB9.1	0.169	0.168	0.468	0.295
22	UJB11.1	0.324	0.246	0.234	0.361
23	UJB13.1	0.733	0.269	0.575	0.310
24	UJB14.1	0.433	0.327	0.288	0.247
25	UJB14.2	0.553	0.313	0.368	0.317
26	UJB15	0.564	0.310	0.431	0.426
27	UJB16.2	0.080	0.161	0.174	0.423
28	UJB17.1	0.249	0.217	0.375	0.313
29	UJB17.2	0.643	0.264	0.367	0.386
30	UJB18.1	0.447	0.304	0.351	0.630
31	UJB19.3	0.007	0.171	0.365	0.638
32	UJB20.2	0.147	0.335	0.227	0.479
33	UJB21.4	0.077	0.225	0.345	0.181
34	UJB21.6	0.427	0.201	0.423	0.254
35	UJB22	0.086	0.340	0.416	0.341
36	UJB24.2	0.126	0.231	0.413	0.259
37	UJB25.1	0.131	0.397	0.229	0.344
38	UJB30.2	0.366	0.222	0.271	0.402

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 38: Evaluación del número de semillas de *Medicago sativa* emergentes y germinadas en diferentes concentraciones de arsénico.

Arsénico		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Total	Promedio
Control	Emergencia completa	1	1	0	2	0	1	1	3	1	3	13	1.3
	Emergencia incompleta	2	2	3	2	1	2	2	1	0	0	15	1.5
	No emergidos	2	2	2	1	4	2	2	1	4	2	22	2.2
0,15 mg/L As	Emergencia completa	1	2	2	3	0	1	1	2	2	2	16	1.6
	Emergencia incompleta	1	2	2	1	4	3	4	1	0	0	18	1.8
	No emergidos	3	1	1	1	1	1	0	2	3	3	16	1.6
0,25 mg/L As	Emergencia completa	2	0	2	2	0	3	2	2	1	2	16	1.6
	Emergencia incompleta	2	3	2	3	0	0	1	3	2	2	18	1.8
	No emergidos	1	2	1	0	5	2	2	0	2	1	16	1.6
0,5 mg/L As	Emergencia completa	0	1	1	2	0	0	0	1	0	3	8	0.8
	Emergencia incompleta	2	1	3	1	0	2	0	2	3	0	14	1.4
	No emergidos	3	3	1	2	5	3	5	2	2	2	28	2.8
0,75 mg/L As	Emergencia completa	2	1	2	0	0	1	2	1	0	3	12	1.2
	Emergencia incompleta	2	1	1	2	0	1	1	2	2	0	12	1.2
	No emergidos	1	3	2	3	5	3	2	2	3	2	26	2.6

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 39. Evaluación del número de semillas de *Medicago sativa* emergentes y germinadas en diferentes concentraciones de boro.

Boro		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Total	Promedio
Control	Emergencia completa	1	1	0	2	0	1	1	3	1	3	13	1.3
	Emergencia incompleta	2	2	3	2	1	2	2	1	0	0	15	1.5
	No emergidos	2	2	2	1	4	2	2	1	4	2	22	2.2
5,8 mg/L B	Emergencia completa	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	8	0.8
	Emergencia incompleta	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3	0.3
	No emergidos	3	4	4	4	5	4	4	4	5	2	39	3.9
6,8 mg/L B	Emergencia completa	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3	0.3
	Emergencia incompleta	0	0	2	0	3	1	3	1	1	2	13	1.3
	No emergidos	5	4	3	5	2	4	2	4	3	2	34	3.4
7,8 mg/L B	Emergencia completa	0	2	1	1	0	0	0	0	0	2	6	0.6
	Emergencia incompleta	1	2	0	2	1	1	1	1	2	1	12	1.2
	No emergidos	4	1	4	2	4	4	4	4	3	2	32	3.2
8,8 mg/L B	Emergencia completa	1	0	0	0	0	3	0	0	2	2	8	0.8
	Emergencia incompleta	2	3	2	0	2	2	2	0	1	2	16	1.6
	No emergidos	2	2	2	5	3	0	3	5	2	1	25	2.5

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 40. Evaluación de la longitud (cm) de la raíz de las semillas de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de arsénico.

Arsénico		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Total	Promedio
Control	Emergencia completa	4.50	3.30	0.00	3.65	0.00	2.00	2.40	4.70	6.50	3.00	30.05	3.01
	Emergencia incompleta	0.95	1.60	1.13	1.25	0.10	1.55	2.00	0.50	0.00	0.00	9.08	0.91
0,15 mg/L As	Emergencia completa	2.50	3.13	3.55	3.56	0.00	7.00	4.00	4.05	3.65	3.25	34.69	3.47
	Emergencia incompleta	2.00	2.80	0.20	0.80	3.32	1.56	0.75	0.70	0.00	0.00	12.13	1.21
0,25 mg/L As	Emergencia completa	2.45	0.00	5.50	3.35	0.00	4.26	4.55	4.30	2.50	6.20	33.11	3.31
	Emergencia incompleta	0.75	1.76	4.25	0.46	0.00	0.00	1.50	1.60	1.25	1.55	13.12	1.31
0,5 mg/L As	Emergencia completa	0.00	5.00	3.60	3.35	0.00	0.00	0.00	2.10	0.00	4.90	18.95	1.90
	Emergencia incompleta	1.00	0.80	0.70	3.00	0.00	2.25	0.00	1.00	2.83	0.00	11.58	1.16
0,75 mg/L As	Emergencia completa	3.90	2.80	3.35	0.00	0.00	4.00	4.50	2.50	0.00	3.50	24.55	2.46
	Emergencia incompleta	1.15	0.10	0.20	1.50	0.00	0.40	0.80	0.85	0.85	0.00	5.85	0.59

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 41. Evaluación de la longitud (cm) de la raíz de las semillas de *Medicago sativa* en diferentes concentraciones de boro.

Boro		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	Total	Promedio
Control	Emergencia completa	4.50	3.30	0.00	3.65	0.00	2.00	2.40	4.70	6.50	3.00	30.05	3.01
	Emergencia incompleta	0.95	1.60	1.13	1.25	0.10	1.55	2.00	0.50	0.00	0.00	9.08	0.91
5,8 mg/L B	Emergencia completa	0.25	1.80	0.80	2.50	0.00	0.00	2.50	4.80	0.00	6.70	19.35	1.94
	Emergencia incompleta	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.00	0.00	0.00	1.05	1.85	0.19
6,8 mg/L B	Emergencia completa	0.00	2.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.15	3.15	9.20	0.92
	Emergencia incompleta	0.00	0.00	0.30	0.00	1.13	0.30	2.36	1.00	0.00	1.50	6.59	0.66
7,8 mg/L B	Emergencia completa	0.00	3.95	2.80	2.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.45	11.80	1.18
	Emergencia incompleta	0.90	0.80	0.00	1.75	1.50	1.00	1.20	1.40	2.05	1.30	11.90	1.19
8,8 mg/L B	Emergencia completa	3.40	0.00	0.00	0.00	0.00	2.36	0.00	0.00	4.00	3.05	12.81	1.28
	Emergencia incompleta	0.60	1.26	1.55	0.00	3.90	1.80	1.85	0.00	1.00	0.95	12.91	1.29

Fuente: Elaboración propia

Medios y reactivos utilizados

Medio levadura manitol agar con rojo de congo (LMA-RC) o azul de bromotimol (LMA - ABT)

Manitol	10 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Indicador Rojo de congo:

Rojo de congo al 0.0025 %	10 ml/L de LMA
---------------------------	----------------

Azul de bromotimol 0.5% en alcohol al 70%	5 ml/L de LMA
---	---------------

Medio Lactosa levadura (LLA)

Lactosa	10 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
NaCl	0.2 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Reactivo de Benedict

Solución A

Citrato de sodio	17.3 g
Carbonato de sodio	10 g
Agua destilada	10 ml

Solución B

Sulfato de cobre	1.73 g
Agua destilada	10 ml

Mezclar la solución A con la solución B al momento de usar y envasar hasta 100 ml con agua destilada.

Medio peptona glucosa con púrpura de bromocresol (PGA - PBC)

Glucosa	5 g
Peptona	10 g
Agar	15 g
Púrpura de bromocresol	10 ml
Agua destilada	1000 ml
pH	6.8

Medio Jensen para leguminosas

CaHPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
NaCl	0.2 g
FeCl ₃	0.1 g

Elementos traza 1 ml, por cada litro de agua destilada. Se esteriliza por autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Solución de elementos traza: 0.05 % Mn, 0.05% Zn, 0.005% Mo, 0.005% Cu. La solución se prepara en agua destiladaa y se acidula con gotas de HCl concentrado, para facilitar la disolución de los elementos. Se esterilizó por autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Cuadro 42: Caracterización físicoquímica del suelo agrícola del Valle de Locumba *

Análisis físico - químico del suelo	M1	M2	M3	Promedio	Datos bibliográficos
Conductividad eléctrica (dS/m)	1.33	1.85	1.25	1.48	2.44
Intercambio catiónico (meq/100g mta.)	18.00	9.20	17.60	14.93	12.00
Mo (%)	1.78	1.92	1.65	1.79	1.70
pH	8.22	8.37	8.27	8.30	7.70
N (g N ₂ /kg suelo)	1.40	1.60	1.10	1.37	-

*Profundidad aprox. 20 cm de la superficie del suelo. (Fuente: Elaboración propia.)

IMÁGENES TOMADAS



Figura 9 : Valle de Locumba – Anexo de Oconchay



Figura10: Vainas de *Medicago sativa*



Figura 11: Nódulos de *Medicago sativa*

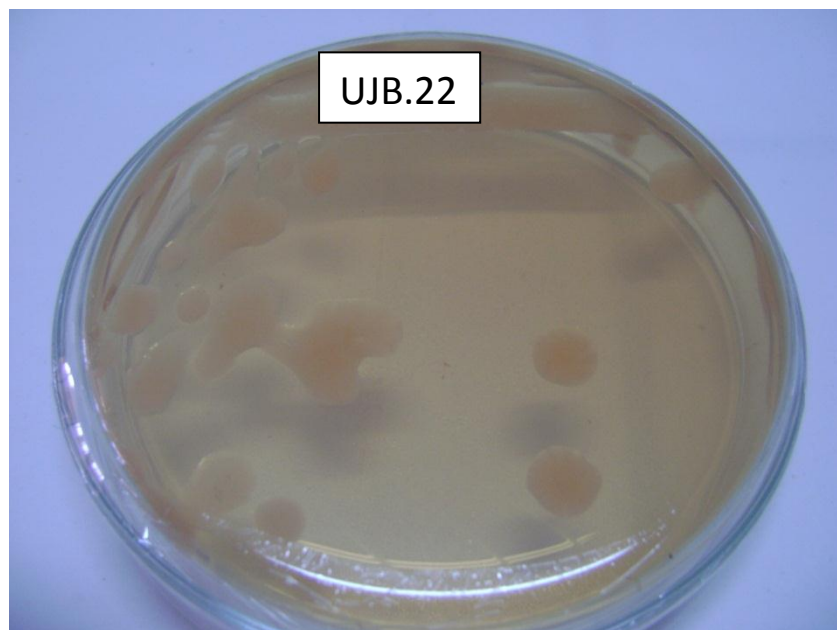


Figura 12: Cepas de *Sinorhizobium meliloti* aisladas de *Medicago sativa*

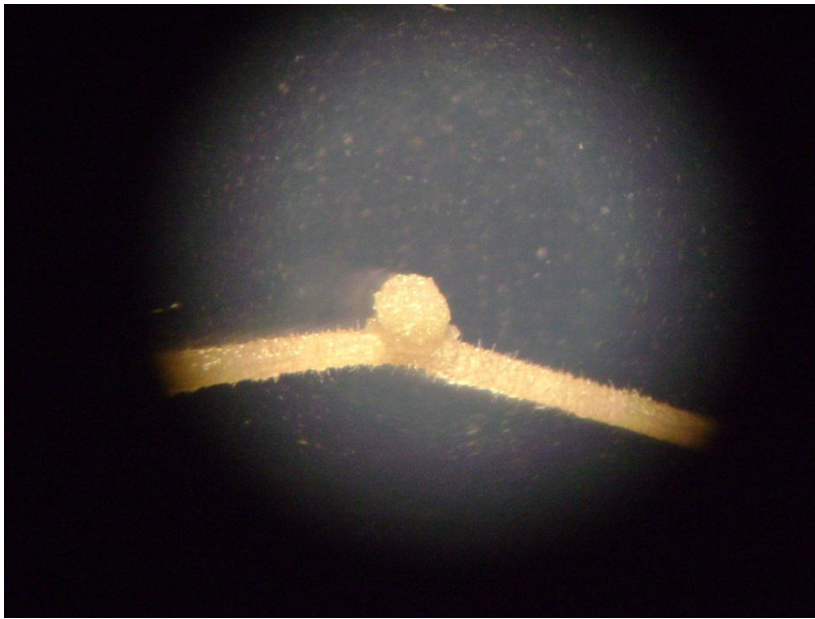


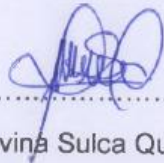
Figura 13: Nódulos d *Medicago sativa* *in vitro* – Fase de autenticación

Cuadro 43: Valores máximo permisibles para el agua de riego según DIGESA

CATEGORÍA 3: RIEGO DE VEGETALES Y BEBIDAS DE ANIMALES

PARÁMETROS PARA RIEGO DE VEGETALES DE TALLO BAJO Y TALLO ALTO		
PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR
Fisicoquímicos		
Bicarbonatos	mg/L	370
Calcio	mg/L	200
Carbonatos	mg/L	5
Cloruros	mg/L	100-700
Conductividad	(uS/cm)	<2 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	15
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	40
Fluoruros	mg/L	1
Fosfatos - P	mg/L	1
Nitratos (NO3-N)	mg/L	10
Nitritos (NO2-N)	mg/L	0,06
Oxígeno Disuelto	mg/L	> =4
pH	Unidad de pH	6,5 – 8,5
Sodio	mg/L	200
Sulfatos	mg/L	300
Sulfuros	mg/L	0,05
Inorgánicos		
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0,05
Bario total	mg/L	0,7
Boro	mg/L	0,5-6
Cadmio	mg/L	0,005
Cianuro Wad	mg/L	0,1
Cobalto	mg/L	0,05
Cobre	mg/L	0,2
Cromo (6+)	mg/L	0,1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2,5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0,2
Mercurio	mg/L	0,001
Niquel	mg/L	0,2
Plata	mg/L	0,05
Plomo	mg/L	0,05
Selenio	mg/L	0,05
Zinc	mg/L	2
Orgánicos		
Acetes y Grasas	mg/L	1
Fenoles	mg/L	0,001
S.A.A.M. (detergentes)	mg/L	1
Plaguicidas		
Aldicarb	ug/L	1
Aldrin (CAS 309-00-2)	ug/L	0,004
Clordano (CAS 57-74-9)	ug/L	0,3
DDT	ug/L	0,001
Dieldrin (N° CAS 72-20-8)	ug/L	0,7
Endrin	ug/L	0,004

Fuente: Diario Nacional El Peruano, Lima 31 de julio del 2008.



.....
MSc. Liduvina Sulca Quispe



.....
Bach. Carla Calizaya Limaco