



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas
Tesis de Licenciatura

Estudio de la inoculación de la gramínea forrajera *Festuca arundinacea* con actinobacterias y su efecto en el alivio del estrés causado por metales pesados

Ailen Sac Himelfarb

Directora: Dra. Ivana Florencia Della Mónica
Codirector: Dr. Leopoldo Javier Iannone

Laboratorio de Micología, Fitopatología y Liquenología (DBBE)

Julio 2024

Ailen sacHimelfarb.

**Dra Ivana Florencia Della
Mónica**

Dr Leopoldo Javier Iannone

Ailen Sac Himelfarb

Índice

Resumen	4
Abstract	6
Agradecimientos	8
Introducción	9
1. Problemática: Contaminación por metales pesados	9
2. Estrategias de remediación	16
3. Uso de <i>Festuca arundinacea</i> en fitorremediación	18
4. Asistencia de la fitorremediación mediante la aplicación de microorganismos	19
Objetivos e hipótesis	24
Materiales y métodos	25
1. Estudio del efecto del Cu^{2+} y Zn^{2+} sobre la germinación y desarrollo de <i>Festuca arundinacea</i>	25
2. Selección de actinobacterias tolerantes a metales pesados	26
3. Inoculación de plántulas de <i>Festuca arundinacea</i> con bacterias seleccionadas y estudio del efecto sobre la tolerancia a Cu^{2+}	28
4. Análisis estadísticos	31
Resultados	32
1. Estudio del efecto de los metales pesados sobre la germinación y desarrollo de <i>Festuca arundinacea</i>	32
1.1 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre la germinación de <i>Festuca</i> <i>arundinacea</i>	32
1.2 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre el desarrollo del vástago de <i>Festuca arundinacea</i>	34
1.3 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre el desarrollo de la raíz de <i>Festuca arundinacea</i>	35
1.4 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre la germinación de <i>Festuca</i> <i>arundinacea</i>	35
1.5 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre el desarrollo del vástago de <i>Festuca arundinacea</i>	37
1.6 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre el desarrollo de la raíz de <i>Festuca arundinacea</i>	38
2. Selección de actinobacterias tolerantes a metales pesados (Cu^{2+} y Zn^{2+})	39
3. Efecto de la inoculación de las actinobacterias seleccionadas en el desarrollo de <i>Festuca arundinacea</i> expuesta a Cu^{2+}	42

3.1 Supervivencia de las plantas	45
3.2 Número de macollos por planta	46
3.3 Número de hojas por planta	48
3.4 Longitud del vástago.....	49
3.5 Peso seco de la raíz	52
3.6 Peso fresco del vástago.....	53
3.7 Peso seco del vástago.....	54
3.8 Peso fresco de la planta completa	56
3.9 Peso seco de la planta completa	57
3.10 Aislamiento de las bacterias en plantas inoculadas	59
Discusión	60
Conclusiones	64
Anexo: Medios de cultivo	73
Apéndice: Estadística	74

Resumen

La contaminación por exceso de metales pesados en agua y en el suelo resulta una problemática de gran interés por sus efectos nocivos sobre los seres vivos y el medio ambiente. Se han desarrollado metodologías para biorremediación de suelos afectados, entre las cuales figura la fitorremediación. La misma aprovecha la capacidad de las plantas de absorber y retener los contaminantes en su biomasa, lo cual la vuelve una metodología limpia y relativamente sencilla. Sin embargo, a pesar de tener características que las hacen propicias para estos tratamientos, las plantas pueden verse afectadas por la toxicidad de los metales, lo cual puede solucionarse mejorando el tratamiento con la inoculación de bacterias endofíticas que promuevan su crecimiento y posean sus propios mecanismos para remediar los suelos contaminados. Por ello se plantea el interrogante de si la asociación con actinobacterias endófitas puede mejorar la tolerancia al estrés causado por metales pesados de una planta caracterizada como hiperacumuladora.

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de distintas concentraciones de Cu^{2+} y Zn^{2+} en el desarrollo y la germinación de la gramínea forrajera hiperacumuladora de metales *Festuca arundinacea*. Se propuso como hipótesis que las plantas estudiadas presentan distinta tolerancia a la presencia de Cu^{2+} y Zn^{2+} y que su germinación y desarrollo se ven afectadas según la concentración a la que se exponen. Dado que los metales estudiados son micronutrientes, se propuso como predicción que la germinación y desarrollo serían menores al aumentar la concentración de los metales. Además, se propuso como hipótesis que ciertas actinobacterias endofíticas con características promotoras de crecimiento vegetal in vitro, aisladas de otra gramínea forrajera, presentan tolerancia a los metales de interés mencionado. Como última hipótesis se planteó que *Festuca arundinacea* es susceptible de ser colonizada por las cepas de actinobacterias seleccionadas y que estas generan un alivio de los efectos tóxicos sobre el desarrollo del hospedante.

Para evaluar la toxicidad de los metales en las plantas se diseñó un ensayo de germinación en caja de Petri, estudiando la proporción de semillas germinadas por caja, así como el desarrollo del vástago y la raíz de las plántulas. Por otro lado, se estudió la metalotolerancia de seis cepas de actinobacterias aisladas de la gramínea *Bromus auleticus*, mediante ensayos de crecimiento en tubos de ensayo con medio líquido ISP2 suplementado con concentraciones crecientes de los metales cobre y zinc, a partir de los cuales se determinó la tolerancia según una escala de crecimiento cualitativa de crecimiento de las actinobacterias. Además, se complementó este ensayo con un experimento en placa de petri con medio ISP2 sólido suplementado con cobre para evaluar el crecimiento de las actinobacterias en este medio. Las diferencias observadas entre las cepas permitieron

seleccionar dos actinobacterias tolerantes con potencial biorremediador (31A6TWB2.1, *Micromonospora halotolerans*) y 44A7TWB1.1, *Streptomyces* sp.).

Finalmente, las cepas seleccionadas fueron inoculadas en plántulas pregerminadas de *Festuca arundinacea* que fueron crecidas en sustrato con distintas concentraciones de Cu^{2+} . Se observó que ambos metales, en alta concentración tuvieron un efecto negativo sobre la germinación y desarrollo de las plantas a concentraciones, pero los efectos del Cu^{2+} se observaron a concentraciones mucho menores que el zinc. Las actinobacterias promotoras de crecimiento estudiadas mostraron sensibilidad diferencial al cobre y zinc, y se pudieron seleccionar dos cepas tolerantes a las concentraciones de cobre a las que las plantas mostraron efectos de estrés en su germinación y desarrollo. *Festuca arundinacea* pudo ser colonizada por las actinobacterias seleccionadas, y sus parámetros de crecimiento mejoraron en la mayor concentración de cobre a la cual fue sometida.

Se notó además que, a concentraciones menores de metal, la inoculación de las bacterias resultaría una desventaja para la planta, presumiblemente por el costo del establecimiento del vínculo planta-bacteria. Este efecto negativo no se observó en altas concentraciones de metal incluso las plantas inoculadas presentaron mejores parámetros vegetales en estas condiciones. Esto podría indicar que las actinobacterias confieren ventajas para el crecimiento vegetal en condiciones de estrés causado por metales pesados.

El presente estudio confirma entonces que existe la posibilidad de utilizar actinobacterias endófitas promotoras de crecimiento aisladas de una planta nativa con el fin de mejorar la tolerancia al estrés por metales pesados de la planta hiperacumuladora *Festuca arundinacea*.

Study of the inoculation of the forage grass *Festuca arundinacea* with actinobacteria and its effect on alleviating heavy metal stress

Abstract

Heavy metal contamination in water and soil is a significant issue due to its harmful effects on living beings and the environment. Methodologies for bioremediation of affected soils have been developed, among which phytoremediation stands out. This approach leverages the ability of plants to absorb and retain contaminants in their biomass, making it a clean and relatively simple method. However, despite having characteristics that make them suitable for these treatments, plants can be affected by the toxicity of metals, which can be addressed by enhancing the treatment with the inoculation of endophytic bacteria that promote their growth and possess their own mechanisms for remediating contaminated soils. Therefore, the question arises as to whether the association with endophytic actinobacteria can improve the stress tolerance caused by heavy metals in a plant characterized as a hyperaccumulator.

This study examined the effects of different concentrations of Cu^{2+} and Zn^{2+} on the growth and germination of the metal hyperaccumulating forage grass *Festuca arundinacea*. It was hypothesized that the studied plants exhibit different tolerances to the presence of Cu^{2+} and Zn^{2+} and that their germination and growth are affected by the concentration to which they are exposed. Since the studied metals are micronutrients, it was predicted that germination and growth would decrease with increasing metal concentrations. Additionally, it was hypothesized that certain endophytic actinobacteria with plant growth-promoting characteristics in vitro, isolated from another forage grass, exhibit tolerance to the mentioned metals of interest. Lastly, it was proposed that *Festuca arundinacea* is susceptible to colonization by the selected actinobacterial strains, and that these strains alleviate the toxic effects on the host's development.

To evaluate metal toxicity in plants, a germination assay was designed in Petri dishes, studying the proportion of seeds germinated per dish, as well as the development of the shoot and root of the seedlings. On the other hand, the metal tolerance of six actinobacterial strains isolated from the grass *Bromus auleticus* was studied through growth assays in test tubes with ISP2 liquid medium supplemented with increasing concentrations of copper and zinc, from which tolerance was determined according to a qualitative growth scale of the actinobacteria. This assay was complemented with an experiment on solid ISP2 medium

supplemented with copper to evaluate the growth of the actinobacteria in this medium. The observed differences between the strains allowed for the selection of two tolerant actinobacteria with bioremediation potential (31A6TWB2.1, *Micromonospora halotolerans*) and 44A7TWB1.1, *Streptomyces* sp.).

Finally, the selected strains were inoculated into pregerminated seedlings of *Festuca arundinacea* that were grown in substrate with different concentrations of Cu^{2+} . It was observed that both metals, at high concentrations, had a negative effect on the germination and development of the plants, but the effects of Cu^{2+} were observed at much lower concentrations than zinc. The growth-promoting actinobacteria studied showed differential sensitivity to copper and zinc, and two strains tolerant to the copper concentrations at which the plants showed stress effects in their germination and development were selected. *Festuca arundinacea* could be colonized by the selected actinobacteria, and its growth parameters improved at the highest concentration of copper to which it was subjected.

It was also noted that at lower metal concentrations, the inoculation of the bacteria would be a disadvantage for the plant, presumably due to the cost of establishing the plant-bacteria relationship. This negative effect was not observed at high metal concentrations; even the inoculated plants showed better vegetative parameters under these conditions. This could indicate that actinobacteria confer advantages for plant growth under stress caused by heavy metals.

This study thus confirms the potential to use plant growth-promoting endophytic actinobacteria isolated from a native plant to improve the stress tolerance of the heavy metal hyperaccumulator *Festuca arundinacea*.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores Ivy y Leo por recibirme en el laboratorio, y acompañarme durante toda mi tesina.

A mi familia por apoyarme durante toda mi formación, por haberme incentivado a hacerme siempre preguntas, por estar siempre. A mis papás, mi abuela, mi hermano y a la Negrita y a Tuti.

A mi novio Ale, a su mamá Pato y a Micaela que estuvieron también para mí cuando estuve estresada estudiando, me cuidaron y me recibieron siempre con tanto cariño.

A todos mis amigos por estar durante toda la carrera acompañándome y dejándome acompañarlos, siempre con abrazos, comida y mate para compartir.

A la gente del Coro de Ciencias Exactas y Naturales, a Gus, que siempre me motivó a seguir cantando, lo que siempre me llenó de felicidad (al punto de no ir solo en la semana a la facultad sino también los sábados).

A cada uno de los docentes que me motivaron con su amor por lo que enseñan, tanto en la facultad como en el colegio secundario. Especialmente a Silvi y a Farías.

Gracias especiales a Gonza y Lu y Vicky Novas que me enseñaron estadística para mi tesis.

Gracias a la gente del INMIBO, especialmente del laboratorio 69. A Pato por invitarme al laboratorio. Y a todos los doctorandos e investigadores. Gracias a Nati, Dani y Martín por la paciencia y ayudarme con mis plantitas.

Gracias a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, y a la UBA, por regalarme la posibilidad de encontrar mi vocación.

Introducción

1. Problemática: Contaminación por metales pesados

La conglomeración de la población humana en centros urbanos, con la consecuente transformación de los espacios naturales y afectación de los ecosistemas por las actividades industriales y productivas constituye una de las problemáticas más complejas en la actualidad (Maldonado, 2009). Con la cultura asociada al productivismo, el consumismo con el exceso de residuos, la globalización, la actividad agropecuaria intensiva y extractivismos, además de los cambios en el uso de la tierra, se generan externalidades negativas (García de Salamone, 2021) (costes indirectos de una actividad que no recaen en el productor ni en el usuario, no son privados sino sociales, e incluyen el deterioro de la calidad de vida y la pérdida de oportunidades de producción) (Vázquez Manzanares, 2014). Las mismas deben ser reguladas y tenidas en cuenta para desarrollar técnicas de remediación de los daños (García de Salamone, 2021).

La contaminación se define como la introducción o aumento de sustancias que pueden dañar el medio ambiente y los organismos que viven en él, y puede ser de origen natural o ser causados por actividades antropogénicas. En algunos casos estas sustancias pueden ser biodegradadas por los organismos vivos, pero en otros son persistentes, ingresan en las redes tróficas y a lo largo de los distintos niveles tróficos se incrementa su concentración (Zúñiga, 1999).

En el siglo XXI se ha incrementado exponencialmente la pérdida de calidad de aire, agua y suelos que se encuentran disponibles para actividad agrícola (Singh et al., 2010; Chen et al., 2013). Además de amenazar los sistemas productivos, la contaminación de aguas y suelos compromete la salud pública y la sustentabilidad de los ecosistemas (García de Salamone, 2021). Una de las consecuencias de la actividad antrópica, que como ya se mencionó tiene un impacto significativo en el ambiente, es la acumulación de metales pesados en los ecosistemas (Kabata-Pendias y Mukherjee, 2007).

La definición de metales pesados resulta controversial, ya que no existe un único criterio por el cual se delimitan cuáles son los elementos que pertenecen a este grupo. Aunque algunos autores se basan en su densidad específica (Bjerrum, 1936; Nostrand, 1976; Grant y Grant, 1987; Parker, 1989; Lozet y Mathieu, 1991; Morris, 1992; Streit, 1994; Falbe y Regitz, 1996), en muchos otros casos se utiliza el término para referirse de manera amplia

a metales o metaloides que tienen el potencial de causar toxicidad (Scott y Smith, 1981; Hodgson, et al., 1988). Este último criterio para utilizar el término no tiene bases en datos químicos o toxicológicos, y el mal uso de esta definición podría generar confusiones que conduzcan a una mala legislación y toma de decisiones. Esta problemática es retomada por John Duffus en su trabajo “Heavy metals, a meaningless term?” (Duffus, 2002). Una posible clasificación práctica de los metales descrita por este autor, que presenta la ventaja de estar relacionada con procesos biológicos y ambientales condicionados por sus propiedades químicas (Williams y Frausto da Silva, 1999), es la clasificación por la acidez de Lewis que separa los iones metálicos en Clase A, Clase B o borderline (Ahrlund et al., 1958). Esto se puede observar en la tabla periódica, como se muestra en la figura 1.

1																	18
H																	He
Li	Be																
Na	Mg																
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe(III) Fe(II)	Co	Ni	Cu(II) Cu(I)	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb(IV) Pb(II)	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	#	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	110								

* lanthanide	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
# actinide	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr

Figura 1. Metales clasificados como Clase A, B y borderline sobre tabla periódica. El cobre, plomo y hierro pertenecen a uno u otro grupo según su estado de oxidación. Figura tomada de Duffus, 2002.

Esta clasificación indica la forma que se unen en los complejos que forman los metales, permitiendo predecir ligandos y propiedades de los complejos. Los de Clase A forman complejos con uniones de características principalmente iónicas, lo cual implica que sean móviles y desplazables en el ambiente. Por el contrario, los de Clase B forman uniones de características más covalentes, haciéndolos difíciles de desplazar y favoreciendo que se acumulen, lo cual explica su toxicidad. Estas categorías se refieren a iones específicos de los metales, y se debe tener en cuenta cual es el estado de oxidación (los de carga más alta,

más pequeños y menos polarizables, suelen acercarse más a ser Clase A, y lo contrario ocurre con los de menor carga). Dentro de los borderline se encuentran incluidos metales que se comportan como oligoelementos (son necesarios a bajas concentraciones pero a mayores resultan tóxicos), incluyendo al Zn y Cu(II) (Hooda, 2010), en los cuales se centrará este trabajo y nos referiremos a los metales pesados enfocados en el término que se centra en su toxicidad ambiental.

Los metales pesados se encuentran en el suelo en diferentes formas de retención y disponibilidad: solubles, como iones intercambiables de coloides, acomplejados con materia orgánica, adsorbidos en óxidos e hidróxidos, sulfuros y fosfatos, y constituyendo minerales del suelo. Aunque se encuentran presentes producto de procesos de erosión del suelo y de erupciones volcánicas, la mayor contribución es por las acciones del ser humano (residuos, accidentes y vertidos en actividad industrial, drenajes ácidos en actividad minera, procesamiento de residuos municipales, y otras actividades como construcción y agricultura) (Van-Camp et al., 2004), tal como se muestra en la figura 2.

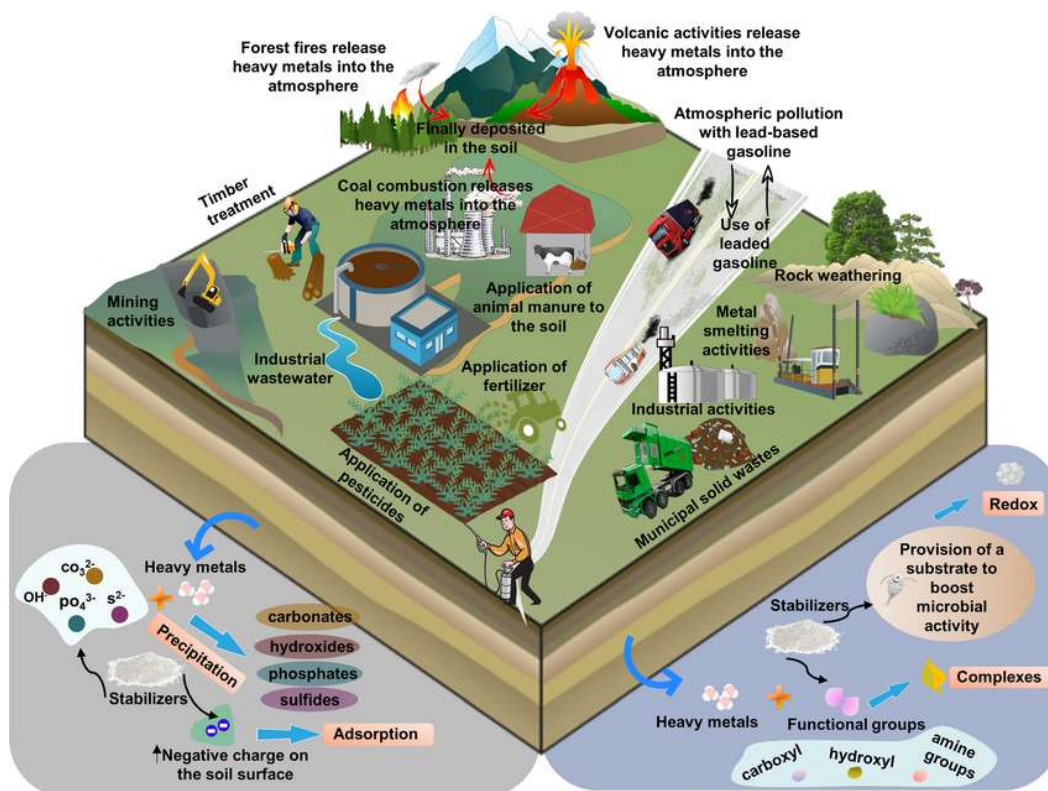


Figura 2. Fuentes de contaminación por metales pesados y mecanismos de estabilización en suelos contaminados. Figura tomada de Cui Wenwen et al., 2023.

La contaminación con metales pesados y metaloides de los suelos, el aire y los

recursos hídricos comprometen la salud y la seguridad alimentaria, constituyéndose en una de las problemáticas de mayor gravedad a nivel global (Reyes et al., 2016). Su incorporación a las cadenas alimenticias y el aumento de la concentración supone una importante problemática ambiental (Naderi et al., 2014).

Los mecanismos principales a nivel molecular de toxicidad que pueden presentar los metales pesados, que se esquematizan en la figura 3, son los siguientes:

1. Bloqueo de grupos esenciales en las biomoléculas: los cationes tienen elevada afinidad por los sulfhidrilos de las proteínas (específicamente residuos de cisteína), lo cual genera su desnaturalización (Schützendübel y Polle, 2002; Peralta-Videa et al., 2009).
2. Desplazamiento de cationes en enzimas: esto genera que la enzima pierda su función. Un ejemplo de una enzima de gran relevancia en organismos fotosintéticos afectada por ese proceso es la RUBISCO (Schützendübel y Polle, 2002; Smeets et al., 2005).
3. Producción de especies reactivas de oxígeno: se forman especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y el radical oxhidrilo (Schützendübel y Polle, 2002). Este radical es sumamente reactivo, inicia reacciones en cadena de radicales libres dañando irreversiblemente hidratos de carbono, ADN, proteínas y lípidos (Mithöfer et al., 2004).

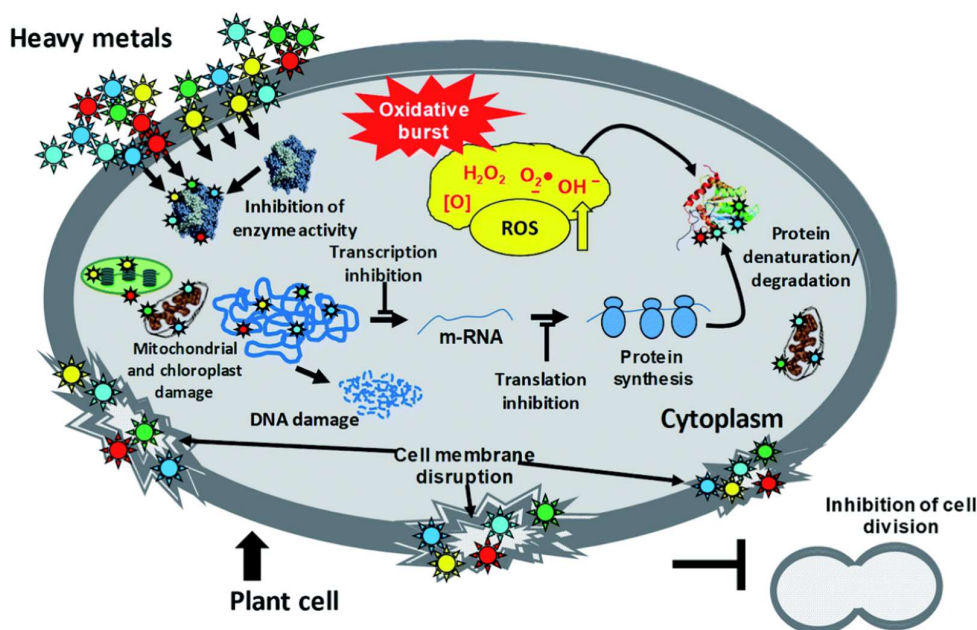


Figura 3. Daños causados por la entrada de metales pesados a la célula de una planta que

conducen a su muerte. Figura adaptada de Asfa et al., 2020.

El zinc es un microelemento esencial para el desarrollo de los seres vivos, que resulta indispensable al actuar como estabilizador de la estructura de las proteínas o como cofactor necesario en la activación de enzimas involucradas en el metabolismo celular (Amezcu-Romero & Lara-Flores, 2017). Esto se observa por ejemplo en los dominios de dedo de zinc de las enzimas, cuyas estructuras se pueden ver en la figura 4.

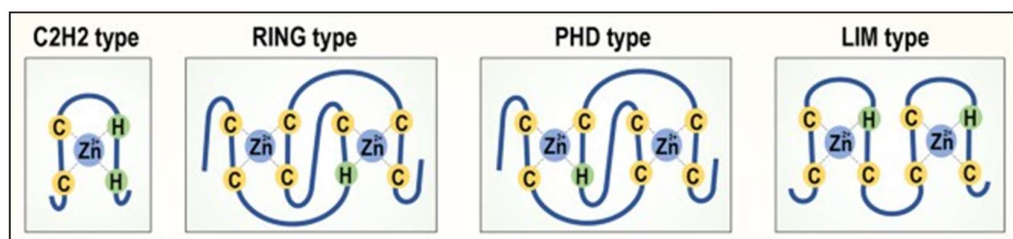


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de distintos dominios de dedos de zinc. Figura adaptada de Cassandri et al., 2017.

El zinc interviene en la síntesis de ácidos nucleicos y la expresión del ADN, ya que integra las enzimas que participan en estos procesos (las polimerasas de los ácidos nucleicos, desacetilasas de histonas y los factores de transcripción). Además, regula la actividad de los factores de inicio de traducción y sintetasas de ARNt, que permiten la síntesis de proteínas. Es indispensable en organismos fotosintéticos, e interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono en plantas. Forma parte de chaperonas que pliegan la Rubisco permitiendo la fijación de dióxido de carbono en las plantas, es necesario para que se mantenga activo el fotosistema II y la anhidrasa carbónica (Amezcu-Romero & Lara-Flores, 2017).

Además de intervenir en estos procesos metabólicos propios de la planta en condiciones óptimas, interviene en situaciones de stress biótico y abiótico, ya que forma parte de las proteínas cinasas que transmite señales dadas por el estrés, y de las alcohol deshidrogenasa y superóxido dismutasa que intervienen en la respuesta de defensa de la planta al estrés. Estos son solo algunos de los múltiples papeles que tiene el zinc en el metabolismo de los organismos, y en particular en las plantas (Amezcu-Romero & Lara-Flores, 2017).

A pesar de sus beneficios y la necesidad de los organismos de incorporar este nutriente, su exceso conlleva el riesgo de generar acumulaciones tóxicas, lo cual conduce a

su inclusión dentro de la clasificación de metales pesados. En el ser humano el zinc se une a una proteína llamada metalotioneína que regula niveles de otros metales también. Como el cuerpo produce más de la proteína para disminuir su concentración libre, pero el cobre tiene más afinidad por esta proteína, esto conduce a la disminución de los niveles de cobre. Después de grandes sobredosis esto no puede regularse y se traduce en vómitos, calambres musculares, diarrea entre otros síntomas (Rahimzadeh et al., 2020). Si la ingesta es crónica puede dar lugar a un síndrome que incluye daños neurológicos que no se podrán revertir a pesar de tratarse los demás síntomas con la suplementación de cobre y normalización de ingesta de zinc (Afrin et al., 2010). En las plantas ocasiona un desbalance metabólico al incorporarse en exceso. Puede reemplazar e inhibir la función del hierro y magnesio y unirse a proteínas y enzimas a las que no debería. Esto puede ocasionar daño celular o la muerte de las células. Además, compite en el suelo con otros nutrientes interfiriendo en su absorción (Amezcu-Romero & Lara-Flores, 2017).

Al igual que el zinc, el cobre es un elemento traza esencial para el crecimiento de las plantas, que forma parte de grupos prostéticos de las enzimas, y que actúa como activador en sistemas enzimáticos (Gupta et al., 1979). Interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono, en la fijación de nitrógeno, síntesis y degradación de proteínas, en la señalización hormonal, en el sistema de transporte de electrones (incluida la síntesis de plastocianina) y en la fotosíntesis. Además, interviene en la síntesis de lignina, en la producción de las semillas y en la resistencia a enfermedades (Bussler, 1981; Romheld & Marschner, 1991; Mir et al., 2021). A pesar de su importancia en el metabolismo de las plantas en concentraciones elevadas presenta toxicidad para las mismas. A nivel fisiológico, en exceso puede causar la descomposición de la clorofila y los carotenoides, aumentar la permeabilidad de la membrana, impactar en la actividad de ARNasas y la peroxidación lipídica (Lidon & Henriques, 1993; Lura et al., 1994). Se puede observar en la figura 5 esquematizado el ingreso del cobre a la célula vegetal y los roles perjudiciales y esenciales que posee. En los seres humanos, aunque es un cofactor catalítico importante (Tapiero et al., 2003), en exceso puede dañar a los componentes celulares, generando estrés oxidativo, daños al ADN, y reducir la proliferación de las células. Según el exceso de cobre ingerido se pueden presentar efectos gastrointestinales, estado mental alterado, dolor de cabeza, taquicardia y coma (Hordyjewska et al., 2014). Se pueden dar síntomas neurológicos, y en formas más graves insuficiencia cardíaca, renal, metahemoglobinemia, hemólisis intravascular, necrosis hepática, encefalopatía y la muerte (Harris et al., 2000).

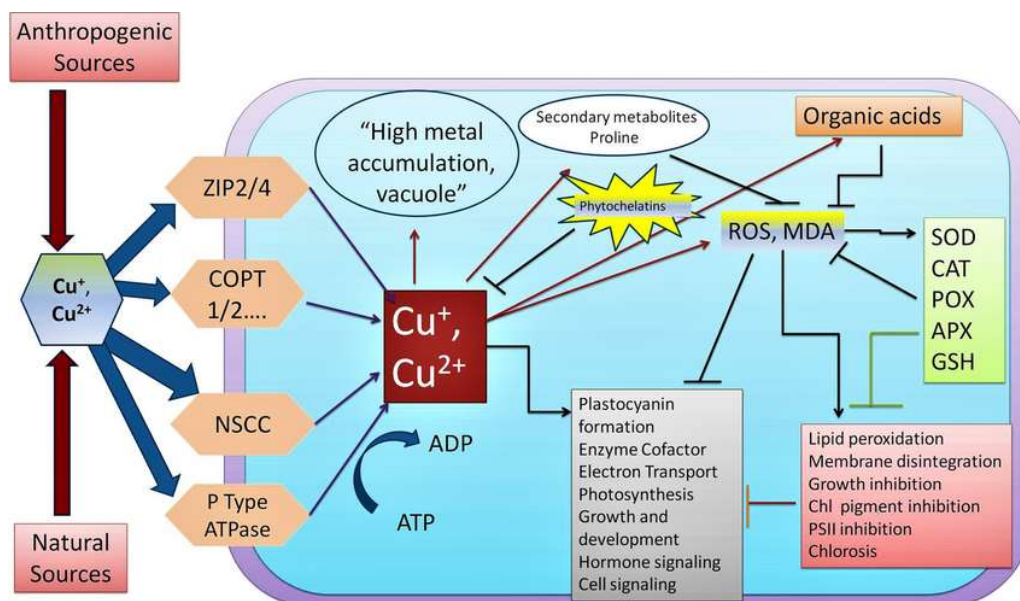


Figura 5. Esquema del ingreso del cobre a la célula vegetal, mostrando vías de ingreso del mismo por absorción por proteínas de transporte, roles beneficiosos y daños que puede ocasionar en exceso. Figura tomada de Mir et al., 2021.

Es importante aclarar de que al tratarse de micronutrientes, tanto el exceso de estos metales en los suelos y el agua como su baja disponibilidad resultan problemáticos a nivel ecológico, ya que por distintas causas tanto naturales como antrópicas puede ocurrir que haya un exceso o deficiencia en la incorporación de estos elementos, y ambos efectos serían nocivos para la biota en los ecosistemas (Adriano et al., 2021).

Los suelos actúan como sumideros de los metales pesados, incluyendo al cobre y al zinc, que resultan de la actividad de los seres humanos, persistiendo y acumulándose (Jodeh et al., 2015; Yan et al., 2018; Nyiramigisha et al., 2021). La presencia de metales pesados en los suelos de distintas regiones de Argentina ha sido estudiada por varios autores, y en diferentes áreas del país. En particular el estudio del cobre y el zinc, por ser elementos traza, se ha abordado tanto desde la problemática del exceso de los mismos en agua y suelo por su toxicidad, como desde el aspecto negativo de su déficit en los suelos, por sus características de micronutrientes. Se ha evaluado la acumulación de estos metales en Tucumán, comparando zonas con inundaciones y actividad antropogénica, verificando que había zonas con concentraciones particularmente elevadas de ambos metales pesados (Corvalán Moya et al., 2024). También en Mendoza se analizaron suelos afectados por la actividad industrial, otros afectados por la agricultura intensiva, suelos urbanos, e incluso suelos vírgenes. Los mayores contenidos de zinc se vieron en los suelos urbanos, pero con valores inferiores a los exigidos por la legislación argentina. Respecto al cobre se reportó en

mayor concentración en los suelos en los cuales se llevaba a cabo la agricultura intensiva (Martí et al., 2011). En el Área Metropolitana de Buenos Aires se determinó que las concentraciones de Cu y Zn superaron los valores máximos permitidos por la regulación argentina para seis vertederos a cielo abierto estudiados (Cittadino et al., 2020). Este es un claro ejemplo de la posibilidad de que se genere un exceso de estos elementos por la actividad antrópica. Por otro lado, se ha observado una disminución en los niveles de cobre y zinc en suelos afectados por la agricultura en el sudeste bonaerense, llegando a acercarse a los valores umbrales de deficiencia sugeridos por Sims & Johnson, 1991 (Crespo et al., 2021). El desarrollo de la minería también ha sido detectado como fuente de contaminación con metales pesados en el país, habiendo detectado como residuos diferentes minerales incluyendo cobre y zinc como componentes secundarios en un pasivo minero en San Juan (Hidalgo et al., 2021). Por otro lado, al estudiar los efectos de la aplicación de fertilizantes en la región pampeana ondulada en la acumulación de elementos traza, incluyendo al cobre y al zinc no se superaron los límites permisibles por la ley argentina sobre residuos peligrosos (García et al., 2019). En otro estudio reciente llevado a cabo en la Pampa húmeda también se observó que los valores de Cu y Zn no superaron los valores establecidos por la legislación internacional. Cabe aclarar que se menciona que hubo un lugar, en el cual se desarrollan actividades industriales que presentó valores de concentración de zinc elevados (Bilos et al., 2019).

Estos antecedentes en conjunto reflejan la importancia de estudiar las zonas afectadas por la actividad antrópica y determinar los valores de metales pesados presentes en cada lugar. En aquellos casos en los que existe un exceso acumulado en el suelo, con los efectos nocivos que esto representa, se torna de suma importancia implementar técnicas de remediación.

2. Estrategias de remediación

Existe actualmente el desafío de buscar soluciones a las problemáticas que implican daños de origen antrópico de los ecosistemas, que en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) y el Acuerdo de París, permitan tanto la prevención como la remediación, permitiendo alcanzar un desarrollo local sostenible (García de Salamone et al., 2021). Los ODS son un conjunto de objetivos globales que buscan alcanzar una serie de metas en los próximos 15 años, vinculadas a la erradicación de la pobreza y la protección del planeta (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2024a).

La biorremediación consiste en un conjunto de metodologías y procesos que aprovechan habilidades catalíticas de seres vivos para lograr la transformación o degradación de contaminantes para alcanzar la mitigación de la contaminación ambiental (Garbisu et al., 2002). Se trata de una estrategia alineada tanto con los ODS 6 y 7 (garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y saneamiento; y garantizar el acceso a energía segura y sostenible invirtiendo en fuentes de energía limpia) como con los ODS 14 y 15 (conservar y usar de forma sostenible los océanos, mares y recursos marinos, teniendo en cuenta su importancia y la gravedad de los impactos de la actividad humana en el mismo; y gestionar los bosques de manera sostenible luchando contra la desertificación, la degradación de tierras y pérdida de la biodiversidad) (García de Salamone, 2021; ONU, 2024b; ONU, 2024c).

La fitorremediación es una rama de la biorremediación, que consiste en remover, estabilizar, degradar o neutralizar compuestos tóxicos que contaminan los suelos y el agua (Méndez et al., 2009). Se basa en cultivar plantas que pueden soportar las concentraciones de los contaminantes y actuar sobre ellos. Por esto es relevante y de gran interés identificar plantas que posean estas características, para utilizarlas en la recuperación de suelos y agua (Alonso-Bravo et al., 2018). Este proceso puede ser utilizado para remediar los ambientes contaminados con metales pesados y permite a la vez recuperar la cubierta vegetal de los suelos contaminados. De acuerdo a su capacidad para acumular metales pesados las plantas se clasifican en:

- Excluyentes: acumulan mucho menos metales en su parte aérea que los que están en el suelo (Covarrubias et al., 2017).
- Indicadoras: acumulan una cantidad de metales en su parte aérea que se relaciona linealmente con la concentración en el suelo (Covarrubias et al., 2017).
- Acumuladoras: acumulan mucho más metal que lo que hay en el suelo (Covarrubias et al., 2017).

Se puede utilizar las plantas de tipo excluyente para llevar a cabo la fitoestabilización de los metales en la raíz dejando inaccesibles los metales a seres vivos que puedan consumir la parte aérea. Por otro lado, otra estrategia consiste en utilizar acumuladoras para realizar la fitoextracción de los metales, para que luego se pueda cosechar y confinar las plantas con metal (Covarrubias et al., 2017).

Se pueden distinguir a las plantas hiperacumuladoras, que pueden acumular niveles muy altos de metales en sus órganos aéreos, por una gran absorción, translocación de la raíz a brote y poder detoxificar los metales y mantenerlos en su parte aérea (Rascio & Navari-izzo, 2011).

3. Uso de *Festuca arundinacea* en fitorremediación

Una de las especies hiperacumuladoras empleadas para la fitorremediación de metales pesados, es *Festuca arundinacea*, tanto por sus ventajas frente a otras plantas para esta actividad principalmente causada por la tolerancia, propiedades de adhesión y producción de ácidos grasos que estimulan bacterias por parte de sus raíces, como por los múltiples estudios que se han llevado a cabo sobre esta planta como fitorremediadora (Khashij et al., 2018). Se han realizado numerosos estudios evaluando la capacidad de fitorremediación de esta planta, tanto como para tratar contaminantes orgánicos como metales pesados. Respecto a esto último, se observó que esta gramínea es capaz de incorporar metales pesados tanto en sus órganos aéreos como raíces, lo cual le da un gran potencial en el campo de la fitorremediación (Khashij et al., 2018). Esta planta es una hierba perenne que alcanza hasta 1,8 metros de altura. Su tallo es recto y sus hojas lineales y puntiagudas, y crece en diversos ambientes. Aunque crece de forma óptima en suelos neutros, es capaz de adaptarse a suelos ácidos (pH de hasta 4.8) y alcalinos (pH de hasta 9.5). Crece vegetativamente desde marzo hasta principios de abril, florece en junio y produce sus semillas en julio, y permanece en recesión estival. En este último período, con la suficiente humedad, puede seguir creciendo. Su crecimiento óptimo ocurre en suelos de textura moderada a pesada con mucha materia orgánica, aunque puede crecer en todo tipo de suelo mientras que no sean arenosos, secos y de textura gruesa (Khashij et al., 2018).

Festuca arundinacea tiene raíces fuertes y tolerantes que le da ventajas en el proceso de fitorremediación de metales (Khashij et al., 2018). Por su resistencia a condiciones húmedas en invierno, tolerancia a la sequía y plasticidad adaptativa, es utilizada ampliamente en suelos con limitaciones edáficas (Cullen, 1997). Por ello, en Argentina es cultivada en gran parte de la llanura pampeana (Carrillo, 2003), y resulta predominante en las pasturas cultivadas en el país (Vega et al., 2016). Se ha estudiado la variación fenotípica intrapoblacional para determinar si es posible planear una selección de los mejores genotipos en la población (lo cual ha tenido resultados positivos). Esto refleja el interés en esta gramínea como forrajera en el país (Rosso, 2016).

Se han desarrollado estudios en los cuales se ha observado la capacidad de *Festuca arundinacea* de tolerar la presencia de Zn y Cu en el suelo en el que crece, además poder acumular estos metales (Khashij et al., 2018). Se pudo comprobar que las plantas de esta especie fueron capaces de sobrevivir y absorber metales en zonas contaminadas por la

actividad minera en Italia en concentraciones tan elevadas como 2000–3000 ppm de zinc, siendo la única planta del estudio capaz de brotar y crecer en el suelo contaminado. Presentó altos niveles de bioconcentración del metal (Cao et al., 2004). *Festuca arundinacea*, además de ser tolerante a este metal, también puede aumentar su movilización en el suelo, aumentando su concentración en lixiviados de suelos contaminados. Esto podría resultar en la contaminación de aguas subterráneas, por lo cual es un aspecto relevante a tener en cuenta al realizar estudios de fitorremediación con esta planta (Zhu et al., 1999).

Existen estudios previos que sugieren la tolerancia al estrés causado por cobre hasta cierto punto *Festuca arundinacea*, con índices de tolerancia de 0.36 con concentración de 50 mg/kg, 0.11 (100 mg/kg), 0.05 (200 mg/kg) y 0 (500 mg/kg). Esto permitió observar que los efectos tóxicos sobre la planta aumentan con la concentración del metal, la biomasa de la planta mostró disminución significativa con el aumento de la concentración de cobre en el suelo (Shan et al., 2011).

Teniendo en cuenta que las plantas hiperacumuladoras tienen una eficiencia de extracción lenta se ha tenido en cuenta sumar quelantes químicos al proceso de fitorremediación con *Festuca arundinacea* (Meers et al., 2005; Saifullah et al., 2009), tales como el EDTA (Saifullah et al., 2009; Zaier et al., 2010). Pero su baja biodegradabilidad y el riesgo de lixiviación de los metales formando complejos muy solubles con el mismo (Grcman et al., 2001; de Souza Freitas & do Nascimento, 2009; Zhao et al., 2011) han conducido a buscar alternativas, tales como agentes quelantes fácilmente biodegradables (Kos and Leštan, 2003; Quartacci et al., 2007). Esto se ha estudiado específicamente en fitoextracción de Cu, Zn y Pb con *Festuca arundinacea* y el quelante biodegradable NTA (ácido nitrilotriacético) (Zhao et al., 2013). Estos precedentes en el uso de *Festuca arundinacea* la vuelven una especie de gran interés para ser utilizada en biorremediación de suelos contaminados con Zn y Cu.

4. Asistencia de la fitorremediación mediante la aplicación de microorganismos

Otra estrategia posible para mejorar la eficiencia de esta planta en el proceso de fitorremediación es la inoculación con bacterias tolerantes a metales pesados. La mayoría de las especies acumuladoras de metales son de lento crecimiento y de poca producción de biomasa (de Bashan et al., 2012), lo cual puede resultar problemático para el proceso de fitorremediación. La inoculación de microorganismos del suelo con propiedades de

promoción de crecimiento vegetal, fitoextracción o fitoestabilización, ha sido una estrategia que se desarrolló con el objetivo de mejorar este proceso. Los microorganismos utilizados en asociación con las plantas en la fitorremediación pueden estimular el crecimiento de la planta a partir de la reducción del efecto del estrés abiótico (producción de ACC desaminasa para reducir los niveles de etileno, estimular la producción de enzimas detoxificantes de especies reactivas de oxígeno), aumentar el desarrollo vegetal con la producción de fitohormonas como el ácido indolacético o mejorando la nutrición de la planta (fijación biológica de nitrógeno, solubilización de fósforo y potasio). Además, pueden movilizar los metales a partir de la producción de ácidos orgánicos y sideróforos (Covarrubias et al., 2017).

Las plantas se asocian a microorganismos (hongos y bacterias) que colonizan la superficie de la raíz en la rizósfera, tal como se muestra en la figura 6, otras que habitan la superficie de las partes aéreas (Hiltner, 1904; Yang et al., 2001; Lindow & Brandl, 2003; Gray & Smith, 2005), y organismos que habitan en el interior de las plantas colonizando los espacios intercelulares y sus tejidos vasculares. Las relaciones que presentan pueden ser beneficiosas, neutras o patogénicas (Tervet & Hollis, 1948; Hallman et al., 1997; Araujo et al., 2002; Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006).

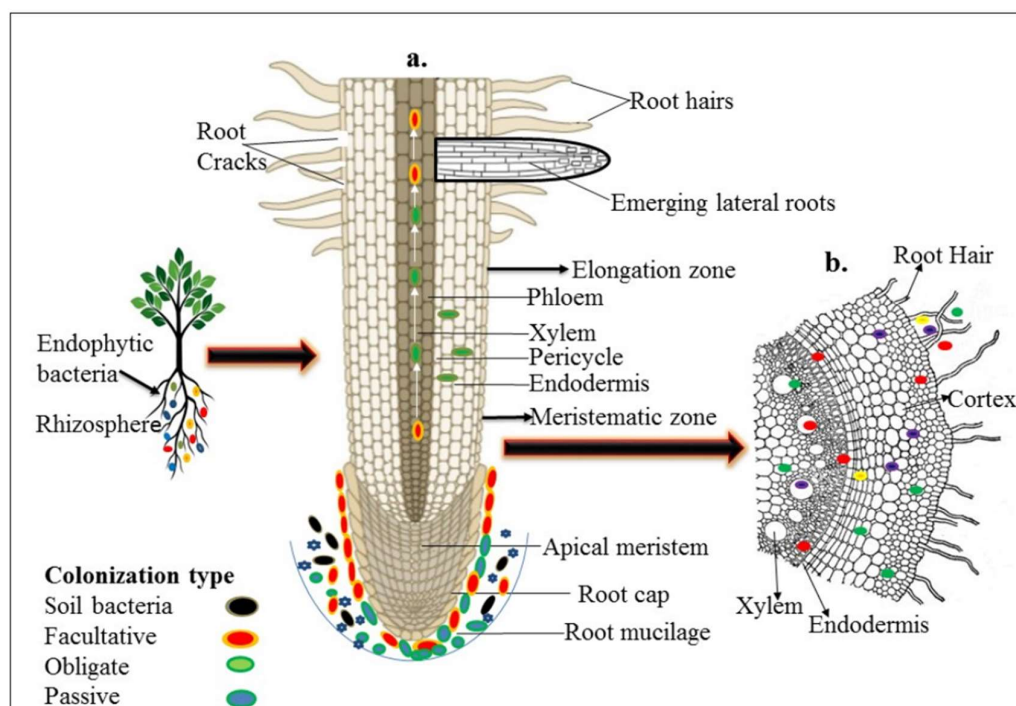


Figura 6. Esquema de la colonización y distribución de bacterias endófitas en la raíz de una planta. (a) Invasión a través de diferentes zonas de la raíz, translocación en el floema y xilema y distintos tipos de colonización. (b) Endófitos en el sitio de entrada (azul), en el espacio

intercelular en vasos de la corteza y el xilema (verde) y bacterias incapaces de colonizar tejidos internos de la planta (rojo y amarillo). Figura tomada de Kumar et al., 2020.

Los microorganismos que se encuentran asociados a los tejidos internos de las plantas, que no causan síntomas de enfermedad son considerados como endófitos (Petrini, 1991). Entre las bacterias, si bien la mayoría de aquellas reportadas como endófitas pertenecen al grupo de Proteobacteria, también las hay pertenecientes a Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006). Es en este último grupo en el que nos centraremos en el presente trabajo.

Actinobacteria es un phylum de gran diversidad (Ventura et al., 2007), constituido por bacterias gram positivas, con alto contenido de guanina y citosina en su genoma, pared celular de peptidoglicano y que presentan, en su mayoría, crecimiento filamentoso. En su mayoría son aeróbicas y quimioheterótrofas, aunque hay excepciones, y pueden habitar suelo, ambientes acuáticos, ser patógenos de animales o plantas, comensales del intestino, o simbioses de plantas (Barka et al., 2016). En general son saprófitas y habitan el suelo (Mayfield et al., 1972) y en su mayoría pertenecen al género *Streptomyces* (Williams & Vickers, 1988). Representan una gran proporción de los microorganismos presentes en la rizósfera (Lundberg et al., 2012), pero además pueden formar asociaciones endosimbióticas (actinorrizas, género *Frankia*) y endofíticas con las plantas. Producen hifas que se ramifican y, muchas de estas bacterias forman micelio. Se reproducen produciendo esporas asexuales, y también mediante la fragmentación de este micelio. Lo forman en cultivos líquidos y sólidos, pero en estos últimos forman hifas aéreas para producir esporas reproductivas (Flärdh & Buttner, 2009; van Dissel et al., 2014), aunque esto no ocurre en todos los grupos dentro del phylum (cabe aclarar que incluso algunas no producen verdadero micelio como es el caso de *Rhodococcus* (Locci & Schaal, 1980), y otras como *Corynebacterium* directamente no producen micelio) (Barka et al., 2016).

La asociación de las plantas con actinobacterias hace más efectivo el proceso de fitorremediación, ya que las rizobacterias pueden aumentar la absorción y translocación de los metales (Sim et al., 2019), mientras que los endófitos contribuyen a mejorar la supervivencia de las plantas asociadas en condiciones de estrés, tales como la presencia de metales pesados (Le Vo et al., 2022). Los endófitos pueden promover el crecimiento de las plantas suministrando nutrientes (Tokala et al., 2002), fijando nitrógeno (Shimizu, 2011; Kandpal et al., 2012), y/o por biosíntesis o regulación de fitohormonas. Esto último ocurre principalmente con la producción de AIA (Malfanova et al., 2013), pero también a partir de la reducción de la concentración de etileno con la enzima ACCD (1-aminociclopropano-1-carboxilato-desaminasa) (Jaemsaeng et al., 2018; Tiwari et al., 2018). Por esto son

considerados como recursos genéticos útiles para la remediación ambiental (Le Vo et al., 2022).

Asimismo, los endófitos pueden contribuir a la remediación de metales pesados a partir de los mecanismos de bioacumulación y de la biosorción (Le Vo et al., 2022) con estrategias como las que se representan en la figura 7. La bioacumulación consiste en el transporte de los iones metálicos a través de la membrana celular con gasto de energía (Wilde & Benemann, 1993; Malekzadeh et al., 2002). Los cationes son compartimentalizados o detoxificados por reacciones redox, precipitación, unión covalente y cristalización (Wilde & Benemann, 1993; Malekzadeh et al., 2002). De esta forma, las bacterias pueden acumular intracelularmente los metales pesados contaminantes (Lin et al., 2012). Por otro lado, la biosorción implica la adsorción de los cationes metálicos a los grupos funcionales de pared celular y membranas de los microorganismos involucrados (Khalil et al., 2016). Se propone que los grupos capaces de interacción electrostática con los cationes positivos del metal pesado podrían ser los grupos cargados negativamente (Sahmoune et al., 2009). Se mostró en un estudio que los grupos carbonilo e hidroxilo tienen un papel importante en la biosorción de Cu^{2+} (Kirova et al., 2012). En este sentido, se han detectado sitios de unión (grupos funcionales como carboxilo, oxhidrilo, carbonilo, amino, nitrilo) presentes tanto en biomasa viva como muerta que pueden unirse por interacciones electrostáticas a iones con carga positiva de zinc en especies de *Streptomyces* (Li et al., 2010), demostrando la capacidad de estas bacterias para detoxificar el ambiente de metales pesados como el zinc y el cobre.

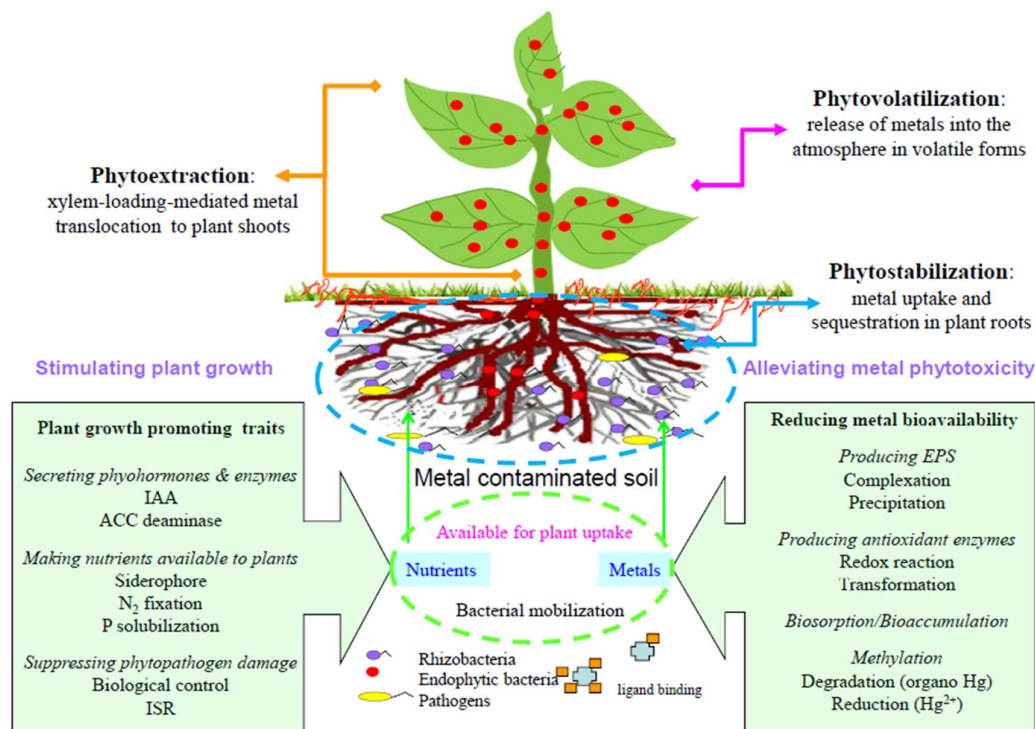


Figura 7. Mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de bacterias endofíticas en suelos contaminados con metales. Figura tomada de Ma et al., 2016.

Dentro de las gramíneas forrajeras nativas de Argentina, *Bromus auleticus* es de gran interés por su cualidad de excelente forrajera domesticada con características que la constituyen como un buen complemento nutritivo entre las pasturas presentes en la región (Zanoniani et al., 2001). Esta se encuentra asociada naturalmente a distintos endófitos, dentro de los cuales se encuentran distintos géneros de actinobacterias. Estudios realizados en el laboratorio han verificado recientemente que estas bacterias poseen *in vitro* características promotoras del crecimiento vegetal (PGP) y podrían aliviar el estrés abiótico de sus hospedantes. Además, estas pueden ser aplicadas a otras forrajeras comerciales para aprovechar estos efectos benéficos. Un ejemplo de esto es el de la inoculación de *Lolium multiflorum* con cepas de *Micromonospora* aisladas de *Bromus auleticus* que mostró que hubo efectos significativos de promoción de crecimiento sobre la gramínea forrajera (Della Mónica et al., 2018). Aunque existen estos antecedentes son escasos los trabajos en los cuales se estudian y muestran los efectos de inocular actinobacterias endofíticas en la forrajera comercial *Festuca arundinacea* para incrementar su tolerancia al estrés causado por los metales pesados, mejorando su potencial como herramienta de fitorremediación. Por el interés ya mencionado que tiene esta gramínea como hiperacumuladora, y el potencial de

mejorar su desempeño en fitorremediación mediante la aplicación de microorganismos benéficos, se planteó el estudio de la tolerancia al cobre y zinc de actinobacterias PGP endófitas de *Bromus auleticus*, y el efecto de su inoculación en la tolerancia de *Festuca arundinacea* a la presencia de metales pesados.

Para llevar a cabo el desarrollo del presente trabajo se propuso la siguiente pregunta de investigación: ¿La asociación con actinobacterias endófitas con capacidades de promoción del crecimiento vegetal *in vitro* podría mejorar la tolerancia de *Festuca arundinacea* al estrés causado por metales pesados (Cu^{2+} o Zn^{2+})?

Objetivos e hipótesis

Como **objetivo general** se propuso estudiar los aspectos biológicos de las asociaciones entre la gramínea forrajera *Festuca arundinacea* y actinobacterias endofíticas, evaluando su tolerancia frente al estrés por un metal pesado (Cu^{2+} o Zn^{2+}).

Los objetivos específicos son:

1. Evaluar el efecto del Cu^{2+} y el Zn^{2+} en la germinación y desarrollo de *F. arundinacea*, seleccionando aquel metal que genere el mayor efecto de toxicidad sobre el hospedante.
2. Seleccionar actinobacterias PGP endófitas de forrajeras nativas que sean tolerantes a los metales pesados (Cu^{2+} y Zn^{2+}).
3. Estudiar el efecto de actinobacterias PGP endófitas en el alivio del estrés por aquel metal pesado (Cu^{2+} o Zn^{2+}) que tuvo un mayor efecto de toxicidad durante la germinación y desarrollo de *F. arundinacea*.

Las hipótesis son:

1. *Festuca arundinacea* presenta distinta tolerancia a la presencia de Cu^{2+} y/o Zn^{2+} , que afectan su germinación y desarrollo, según la concentración a la cual se exponen las semillas.

Predicción: Se espera observar que a medida que se incremente la concentración del metal pesado, disminuya la germinación y crecimiento de plántulas, así como se espera encontrar que las plantas presenten distinta tolerancia a Cu^{2+} y Zn^{2+} .

2. Las actinobacterias PGP endófitas de *B. auleticus* presentan sensibilidad diferencial a Cu^{2+} y Zn^{2+} .

Predicción: Se espera seleccionar al menos una cepa metalotolerante.

3. *Festuca arundinacea* es susceptible de ser colonizada por actinobacterias PGP endófitas de *B. auleticus*. La colonización de *F. arundinacea* con actinobacterias PGP alivia los efectos tóxicos de un metal pesado (Cu^{2+} o Zn^{2+}) en el desarrollo y supervivencia del hospedante.

Predicción: Se espera que la inoculación con actinobacterias promueva, en presencia de metales pesados, una mejora en los parámetros de crecimiento vegetal de las plantas inoculadas con respecto a aquellas no inoculadas.

Materiales y métodos

1. Estudio del efecto del Cu^{2+} y Zn^{2+} sobre la germinación y desarrollo de *Festuca arundinacea*

Se analizó el porcentaje de germinación de semillas de *F. arundinacea* provistas por la empresa Gentos S.A en presencia de diferentes concentraciones de sales de Cu^{2+} y Zn^{2+} . Para ello se desinfectaron superficialmente las semillas con lavandina (22,5 g/l hipoclorito) en agitación durante 20 minutos, y se enjuagaron posteriormente con agua destilada. Luego se colocaron las semillas previamente esterilizadas superficialmente en cada caja de Petri, sobre papel de filtro embebido en una solución estéril de agua destilada y metal en cada una de las concentraciones de sal estudiadas (0, 200, 500, 1000 y 2000 mg/l). Para armar estas soluciones se utilizaron $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para los tratamientos en los que se evaluó el efecto del cobre, y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para los tratamientos en los que se evaluó el efecto del zinc. Se

colocaron 25 semillas por caja, y se realizaron 3 réplicas por nivel de tratamiento (concentración de metal). Esto se muestra en el esquema de la figura 8.

Las semillas se incubaron a 23°C en oscuridad durante una semana y luego se estableció el número de semillas germinadas, y el largo del vástago y la radícula de todas las plántulas de cada caja. Al observar que las semillas de *Festuca arundinacea* no germinaban en las concentraciones estudiadas para el Cu^{2+} , se ajustaron a 0, 50, 100, 200 y 250 mg/l y se repitió el ensayo.

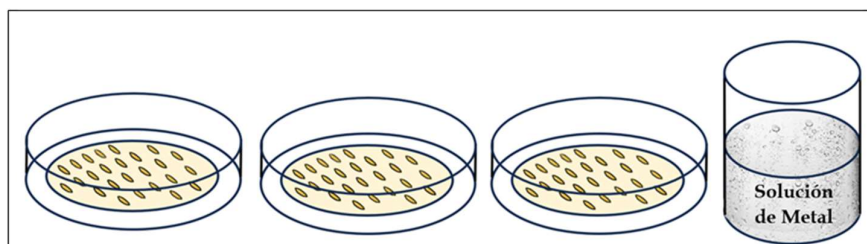


Figura 8. Esquema de ensayo de germinación de *Festuca arundinacea* bajo distintas concentraciones de cobre y zinc. Se realizaron tres réplicas (cada caja constituye una réplica) para cada concentración de metal.

2. Selección de actinobacterias tolerantes a metales pesados

Se estudió el efecto de Cu^{2+} y Zn^{2+} en seis cepas de actinobacterias aisladas endofíticas de la gramínea forrajera nativa *B. auleticus*, obtenidas en el laboratorio (Della Mónica et al., 2017). Se utilizó $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ para los tratamientos en los que se evaluó el efecto del cobre, y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para los tratamientos en los que se evaluó el efecto del zinc. Las cepas seleccionadas para realizar la selección fueron la cepa 31A6TWB2.1 (*Micromonospora* aff. *halotolerans*), la 13A7SB13 (*Amycolatopsis* sp.1), la 38A7GB2 (*Amycolatopsis* sp.2), la 44A7TWB1.1 (*Streptomyces* sp.1), la 11A7TWB1 (*Streptomyces* sp.4) y la 11A7GB1 (*Micromonospora* aff. *palomenae*). Las actinobacterias fueron mantenidas mediante repiques seriados a medio fresco ISP2 agarizado (ver Anexo de medios de cultivo) e incubación a 28-30°C en oscuridad.

Para el ensayo de sensibilidad a los metales pesados, inicialmente se inocularon las bacterias en cajas de petri con medio ISP2 agarizado a distintas concentraciones de los

metales pesados, pero este ensayo presentó el inconveniente que a medida que las concentraciones de metal eran más altas, costaba más que el medio agarizara. Al no poder solucionar este inconveniente se procedió a trabajar con medio líquido ISP2 líquido en tubos, aunque se aprovechó la información obtenida del crecimiento de este ensayo en 400 mg/l de cobre para complementar la información obtenida a partir del resultado del ensayo en medio líquido.

Las bacterias fueron cultivadas en tubos de ensayo con 4 ml de medio ISP2 líquido suplementado con cantidades crecientes de Cu^{2+} o Zn^{2+} con tres réplicas de cada concentración de metal por cepa. Las concentraciones evaluadas fueron 0, 200, 500, 1000 mg/l de zinc, y 0, 500, 1000, 1500 y 2000 mg/l de cobre. El inóculo bacteriano para cada tubo consistió en un cilindro de agar con colonias en activo crecimiento de cada cepa en medio ISP2 agarizado utilizando un sacabocados de 7/32". Esto se esquematiza en la figura 9. Los tubos inoculados se incubaron estáticos durante dos semanas a 28-30°C en oscuridad hasta su visualización.

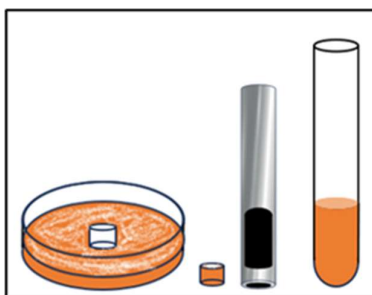


Figura 9. Esquema de inoculación de actinobacterias en medio ISP2 líquido utilizando sacabocados para tomar cilindro de agar de colonias previamente cultivadas. El cilindro de agar se coloca en el medio líquido del tubo de ensayo el cual se incubaba sin agitación.

Se realizó un análisis cualitativo del crecimiento bacteriano en los tubos con concentraciones crecientes de metal, observando su capacidad para desarrollar micelio y estableciendo una escala cualitativa de mayor o menor crecimiento según el mayor o menor crecimiento de la cepa. Hubo casos en los que presentaron crecimiento profuso con presencia de micelio aéreo y esporas en la superficie del medio líquido. En otros se vieron únicamente acumulaciones de bacterias en el interior del medio líquido. Todo esto se tuvo en cuenta al estudiar el crecimiento de las bacterias y los efectos de los metales en su desarrollo.

Se diferenciaron los cultivos sin crecimiento (-), a aquellos con crecimiento escaso evidenciado únicamente por mayor turbidez en el medio (+), con crecimiento moderado con micelio visible a ojo desnudo sin formación de esporas en la superficie (++) y con crecimiento profuso y presencia de micelio aéreo y esporas en la superficie (+++). Estas diferencias se pueden observar en la Figura 10 a, b, c y d respectivamente.

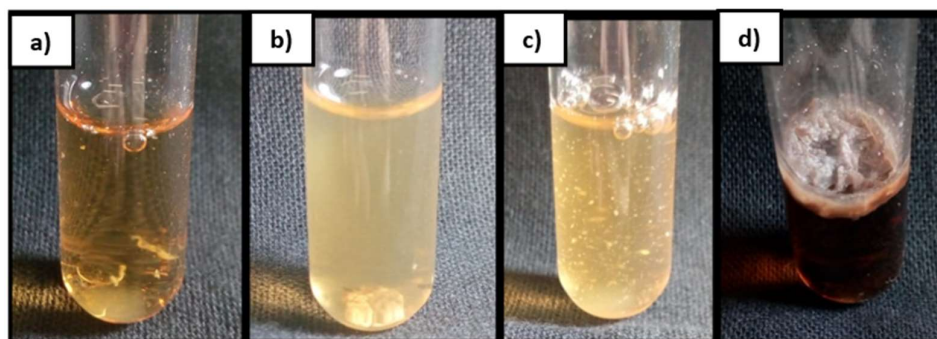


Figura 10. *Diferentes formas de crecimiento de actinobacterias de tres semanas de crecimiento en medio líquido ISP2 sometidas a estrés por distintas concentraciones de metales pesados. (a) sin crecimiento (b) crecimiento escaso evidenciado por turbidez en el medio (+) (c) crecimiento moderado (++) (d) crecimiento profuso (+++)*

Para definir cuáles serían las dos cepas seleccionadas se complementó la información obtenida de este ensayo con otros ensayos realizados en medio sólido en caja de Petri en la concentración de 400 mg/l de cobre. El medio utilizado fue ISP2 agarizado (ver Anexo de medios de cultivo) al cual se le incorporó la solución de metal correspondiente. Todas las bacterias fueron inoculadas en un círculo del mismo diámetro que sirve como referencia para analizar cualitativamente el desarrollo de las cepas. La concentración de cobre que fue analizada en medio sólido es una concentración a la cual las plantas de *Festuca arundinacea* habrían mostrado toxicidad en el ensayo de germinación, para poder seleccionar dos bacterias con potencial para mejorar la tolerancia de las plantas al metal.

3. Inoculación de plántulas de *Festuca arundinacea* con bacterias seleccionadas y estudio del efecto sobre la tolerancia a Cu^{2+}

Se seleccionaron dos actinobacterias (la cepa 31A6TWB2.1 y la cepa 44A7TWB1.1) a partir del screening realizado en la sección anterior, en base a su tolerancia a los metales estudiados. Asimismo, se seleccionó el cobre como metal pesado a estudiar debido a su toxicidad en el modelo.

A partir de la selección de las actinobacterias metalotolerantes y el estudio de los efectos de los metales en *Festuca arundinacea* se pudo elegir el metal cuyos efectos se observaban en las plantas a menores concentraciones, el cobre, y un rango de concentraciones en el que las plantas hubieran germinado pero ya se habría evidenciado toxicidad. De esta forma sería posible mostrar la forma en la que afectaría la inoculación de las bacterias elegidas en el desarrollo de las plantas. No se eligieron concentraciones excesivamente altas del metal para que los efectos no fueran necesariamente letales y que al finalizar el experimento se pudieran medir los parámetros de desarrollo y no limitarse a analizar la supervivencia de las plantas. Entonces las concentraciones de metal elegidas estuvieron en el rango de entre 0 mg/l y 125 mg/l de cobre. En este rango se incluyen las concentraciones a las que se había visto disminuida la germinación y desarrollo de la raíz de forma significativa con respecto al control, y a la cual el vástago mostró una disminución no significativa de la media, esperándose obtener efectos tóxicos en el desarrollo de las plantas sin inocular que permitieran determinar si la inoculación con las bacterias resultaba ventajosa para disminuir estos efectos.

Se pre germinaron semillas de *Festuca arundinacea* desinfectadas superficialmente de forma similar a la descrita en la sección 2. Paralelamente se realizaron suspensiones de esporas y micelio a partir de cultivos frescos con solución fisiológica y se cuantificaron con cámara de Neubauer, llevando a concentración final de 10^7 UFC/ml con el fin de inocular las plántulas (Della Mónica et al., 2018).

Las raíces de las plántulas pre germinadas fueron sumergidas en las suspensiones durante media hora a temperatura ambiente y luego sembradas en macetas con sustrato estéril. Las plántulas se dejaron crecer en macetas individuales sin orificios en la parte inferior con 77 g de tierra mezclada con perlita en proporción 3:1 cada una, regadas día por medio al 80% de capacidad de campo con soluciones de cobre el primer día, y luego mantenidas con agua destilada.

Para calcular el 80% de capacidad de campo se tomaron 9 macetas con orificios en la parte inferior (es decir, 9 réplicas). Se les colocaron 77 g de tierra con perlita y se agregó agua hasta saturar el sustrato, para luego dejarlas percolar. Finalmente, al terminar este proceso, se volvió a pesar la maceta con sustrato, considerando el peso del agua en este

paso como el de 100% cc. A partir del promedio de todas las réplicas realizadas se calculó el valor de 80% cc para mantener todas las macetas en estas condiciones durante todo el desarrollo del experimento.

Se observó el efecto de tres concentraciones (25, 75, 125 mg/l) de Cu^{2+} sobre el desarrollo de *Festuca arundinacea*, con su correspondiente control sin metal, y con y sin inoculación de las dos cepas de actinobacterias PGP endofíticas seleccionadas. Para cada tratamiento se trabajó con 9 réplicas. Las concentraciones a las que se sometieron las plantas de este ensayo fueron elegidas a partir de analizar los resultados de los experimentos de germinación de *Festuca arundinacea* sometida a distintas concentraciones de cobre. Se optó por evaluar los efectos de la inoculación ante el estrés por el cobre en un rango de concentraciones en el que las plántulas habrían podido germinar y crecer, pero en el cual se hubieran evidenciado síntomas de estrés por la presencia del metal.

Las plántulas crecieron durante 30 y 37 días, y al finalizar el experimento se cuantificó la formación de macollos, número de hojas, longitud del vástago, peso seco y fresco de parte aérea y radicular y porcentaje de plantas muertas por tratamiento. Cabe aclarar que una parte de las réplicas se dejó crecer durante 30 días y la restante durante 37 días, para facilitar el proceso de muestreo al finalizar el trabajo. La diferencia de días de crecimiento se tuvo en cuenta en los análisis estadísticos. Para medir peso seco se colocaron las plantas en estufa a 60°C durante 48 hs para luego pesarlas en balanza de precisión. El peso fresco también fue medido en balanza de precisión. Se llevaron a cabo las mediciones pertinentes para una parte de las réplicas un mes después de iniciado el experimento, y otra parte a la semana siguiente, lo cual se tuvo en cuenta en los análisis estadísticos realizados, considerando la semana de muestreo como una covariable.

Se verificó la colonización en las plantas inoculadas aislando las actinobacterias de la raíz, en medio de cultivo TWYE (ver Anexo de medios de cultivo), medio en el cual fueron originalmente aisladas las cepas. Para ello se separó una porción de un centímetro de raíz de cada planta, se lavaron con agua corriente y se las dejó secar durante 10 minutos a 45 °C. Una parte de las raíces fueron esterilizadas superficialmente con lavandina para estudiar la colonización en el interior de la raíz, mientras que otra parte se analizó sin esterilización superficial para detectar además la presencia de las bacterias en el rizoplaneo (protocolo modificado de Della Mónica et al., 2017). Las raíces se trituraron con un mortero con agua destilada. Se realizaron diluciones seriadas para sembrar en placa de Petri, para poder seleccionar aquellas concentraciones en las que se pudieran contar entre 30-300 colonias y distinguir las actinobacterias inoculadas.

4. Análisis estadísticos

Para estudiar el efecto de los metales pesados sobre la germinación de *Festuca arundinacea* se utilizaron modelos lineales generalizados (glm) para distribución binomial. Se verificaron los supuestos del mismo con el paquete DHARMA.

Para observar el efecto de los metales sobre el desarrollo del vástago y radícula de las plántulas se analizaron los datos de las longitudes de ambas partes de las plántulas con Anova de un factor. Se chequearon los supuestos de normalidad y homocedasticidad, modelando la varianza cuando fue necesario. Luego se realizaron contrastes entre tratamientos con Tukey.

Se analizó cualitativamente el crecimiento de las bacterias en medio líquido con Cu^{2+} y Zn^{2+} , estableciendo una escala arbitraria de crecimiento que permitió comparar las distintas cepas y los efectos de los metales sobre ellas.

Se analizó con Anova de dos factores el efecto de las bacterias y de las diferentes concentraciones de metales sobre el desarrollo de las plantas de *Festuca arundinacea* inoculadas. Para estudiar la longitud del vástago y el peso seco y fresco de raíz y vástago y de la planta completa se utilizaron respectivamente modelos lineales simples, considerando una distribución normal de los datos chequeando con el test de Shapiro-Wilk, verificando homocedasticidad con el test de Levene.

Para analizar la supervivencia de las plantas en los tratamientos se utilizó un modelo lineal generalizado de familia binomial. Se estudió además la cantidad de macollos de las plantas y número de hojas, utilizando para cada uno de ellos un modelo lineal generalizado de familia Poisson. Para estos modelos se chequearon los supuestos con el paquete DHARMA. Al realizar los análisis estadísticos aplicando un modelo Poisson, se observó subdispersión de los datos. Esto se corrigió utilizando un modelo COM Poisson y se verificaron los supuestos del nuevo modelo con DHARMA.

En todos los análisis se incluyó la covariable “Semana”, para considerar la variabilidad dada por el momento en que se midieron las réplicas. En aquellos casos en los que se vio un efecto significativo de la misma, se probó que este efecto siguiera la misma tendencia para todos los tratamientos, evaluando que no hubiera interacción entre la covariable y cada tratamiento. Habiendo verificado esto se armó un nuevo modelo en el cuál se incluyó esta

variable como variable aleatoria, para poder estudiar los efectos debidos únicamente a los tratamientos de interés para el estudio.

Resultados

1. Estudio del efecto de los metales pesados sobre la germinación y desarrollo de *Festuca arundinacea*

1.1 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre la germinación de *Festuca arundinacea*

Se analizó la proporción de semillas germinadas para cada tratamiento y el correspondiente control, además de los datos de las mediciones de largo de raíz y de vástago de las plántulas. Se observan las plántulas germinadas con Zn^{2+} en la figura 11.



Figura 11. Germinación y desarrollo de plántulas de *F. arundinacea* luego de una semana

sometidas a estrés por distintas concentraciones de Zn^{2+} y su correspondiente control: (a) 0 mg/l Zn^{2+} (b) 200 mg/l Zn^{2+} (c) 500 mg/l Zn^{2+} (d) 1000 mg/l Zn^{2+} (e) 2000 mg/l Zn^{2+}

Se puede observar que en todas las concentraciones evaluadas de Zn^{2+} hubo germinación. La proporción de semillas germinadas con Zn^{2+} no presentó diferencias significativas para los tratamientos con 200 mg/l ($p=0,9487$), 500 mg/l ($p=0,9993$), y 1000 ($p=0,9994$) mg/L con respecto al control. Sí hubo una disminución significativa de la media de la proporción de las semillas germinadas para 2000 mg/l de Zn^{2+} con respecto al control ($p<0.05$) (figura 11) (Tablas A1, apéndice 2).

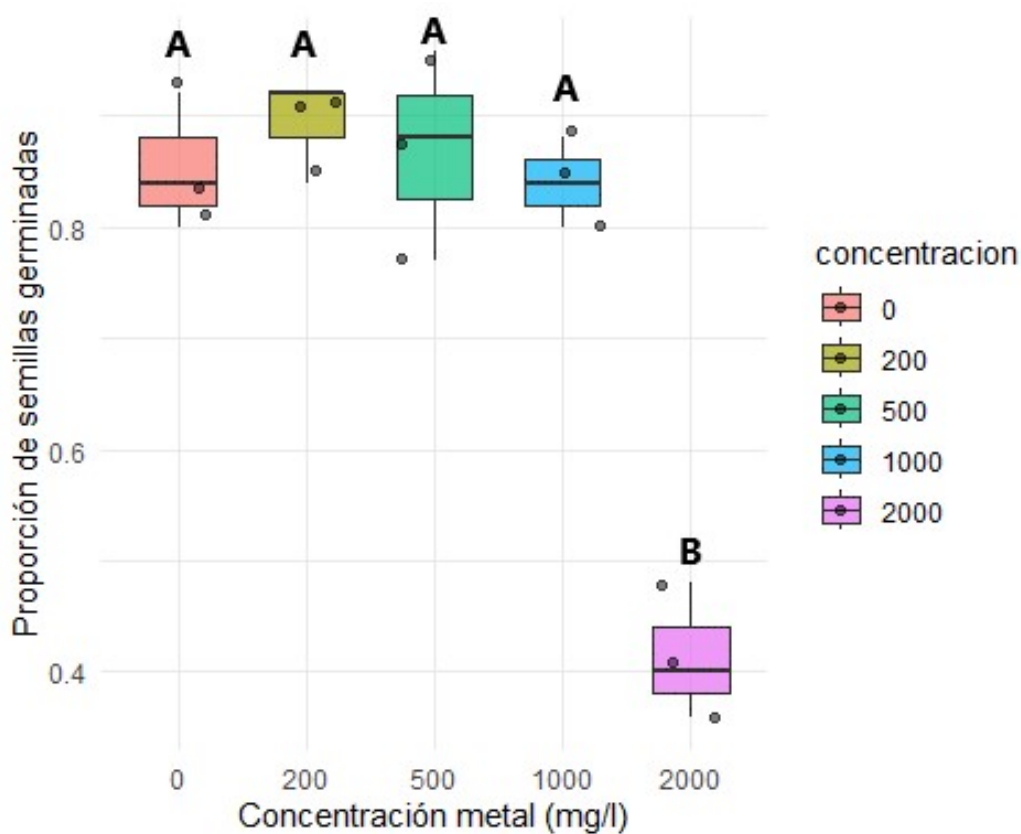


Figura 12. Germinación de semillas de *F. arundinacea* a distintas concentraciones de Zn^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p<0,05$) entre tratamientos.

1.2 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre el desarrollo del vástago de *Festuca arundinacea*

Como se muestra en la figura 13, la presencia de zinc inhibió el desarrollo del vástago en forma dependiente de la concentración, pero este efecto se hizo significativo con respecto al control en concentraciones mayores a 2000 mg/l. Al realizar los contrastes de los tratamientos (Tablas A2, apéndice 2) se observó que la media del tratamiento con 2000 mg/l de Zn^{2+} ($0,293 \pm 0,123$ cm) resultó significativamente menor a la del control ($1,615 \pm 0,454$ cm) ($p < 0,05$), y no hubo diferencias significativas entre el control y las demás concentraciones.

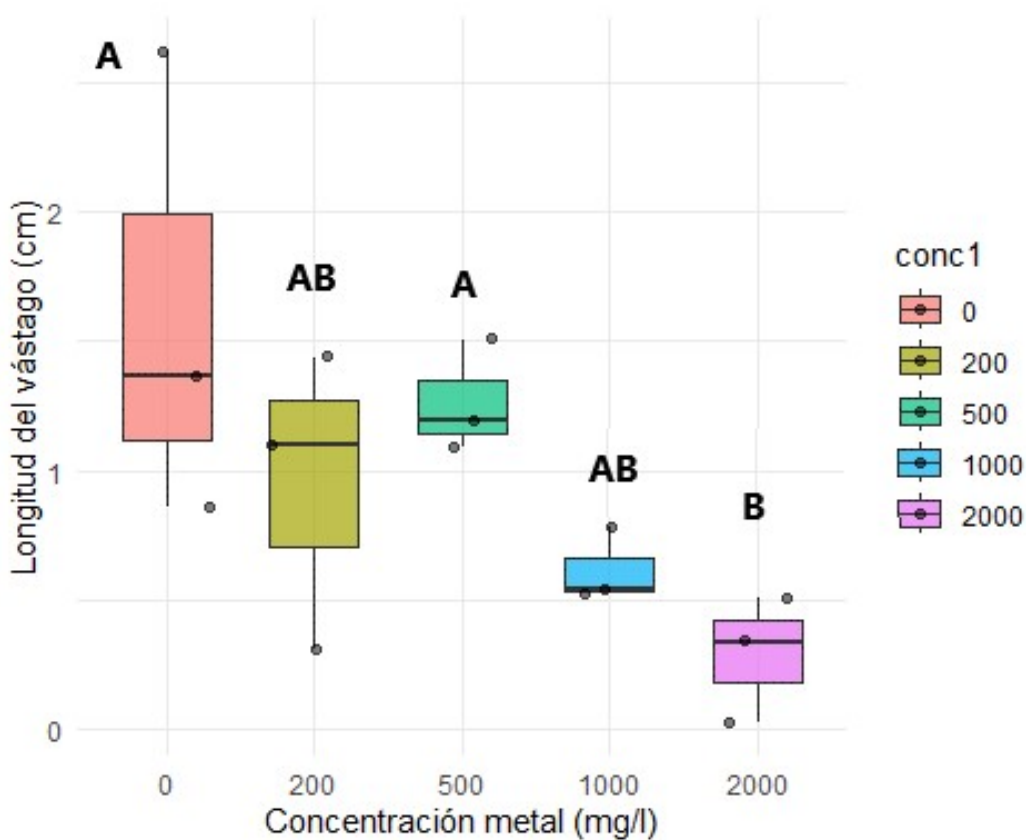


Figura 13. Longitud del vástago de plántulas de *F. arundinacea* a distintas concentraciones de Zn^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

1.3 Estudio del efecto del Zn^{2+} sobre el desarrollo de la raíz de *Festuca arundinacea*

Se observó una disminución en las medias de la longitud de la raíz a mayor concentración de Zn^{2+} (Figura 14), con diferencias significativas con respecto al control ($1,6490 \pm 0,3561$ cm) a partir del tratamiento de 500 mg/l ($0,4429 \pm 0,1289$ cm) ($p < 0,05$) (Tablas A2, apéndice 2).

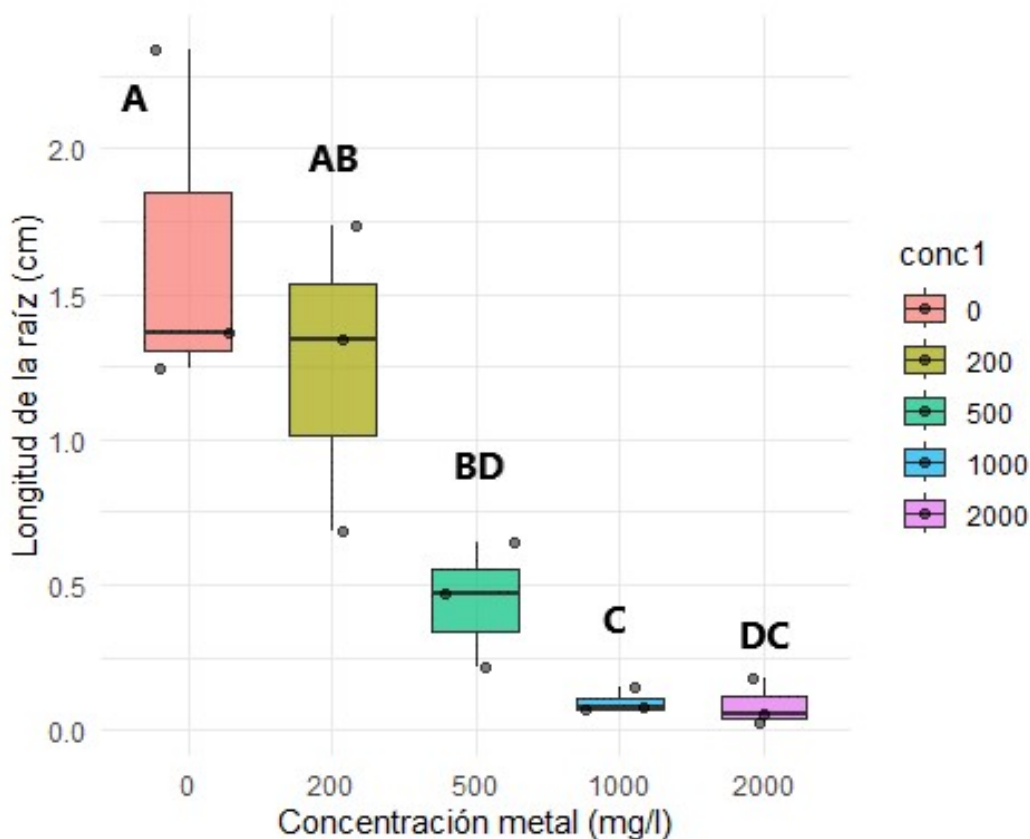


Figura 14. Longitud de la raíz de plántulas de *F. arundinacea* a distintas concentraciones de Zn^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

1.4 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre la germinación de *Festuca arundinacea*

Al igual que con el zinc, se estudió la proporción de semillas germinadas al exponerlas a diferentes concentraciones de cobre y un control, además de medir largo de raíz y de vástago de las plántulas.

Los ensayos realizados con soluciones de Cu^{2+} de 0 mg/l, 200 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l y 2000 mg/l solo mostraron germinación en el control y en 200 mg/l. Debido a esto, se eligieron concentraciones menores a 500 mg/l (0, 50, 100, 200 y 250 mg/l de Cu^{2+}) y se realizó nuevamente el ensayo de germinación para este metal (figura 15).



Figura 15. Germinación y desarrollo de semillas de *F. arundinacea* durante una semana sometidas a estrés por distintas concentraciones de Cu^{2+} y su correspondiente control: (a) 0 mg/l Cu^{2+} (b) 50 mg/l Cu^{2+} (c) 100 mg/l Cu^{2+} (d) 200 mg/l Cu^{2+} (e) 250 mg/l Cu^{2+}

En todas las concentraciones de Cu^{2+} evaluadas se observó una marcada disminución en la germinación, con pocas semillas germinadas a concentraciones de 250 mg/l. Al analizar los datos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el porcentaje de germinación entre la mayoría de los tratamientos, con una disminución de la media de las semillas germinadas a mayores concentraciones de metal en la solución utilizada. Particularmente las diferencias respecto al control se observaron a partir de la concentración

de 100mg/l de cobre. Aún en los casos en los que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, se observa una tendencia de disminución de la media a mayores concentraciones de metal (Tablas A3, apéndice 2)(Figura 16).

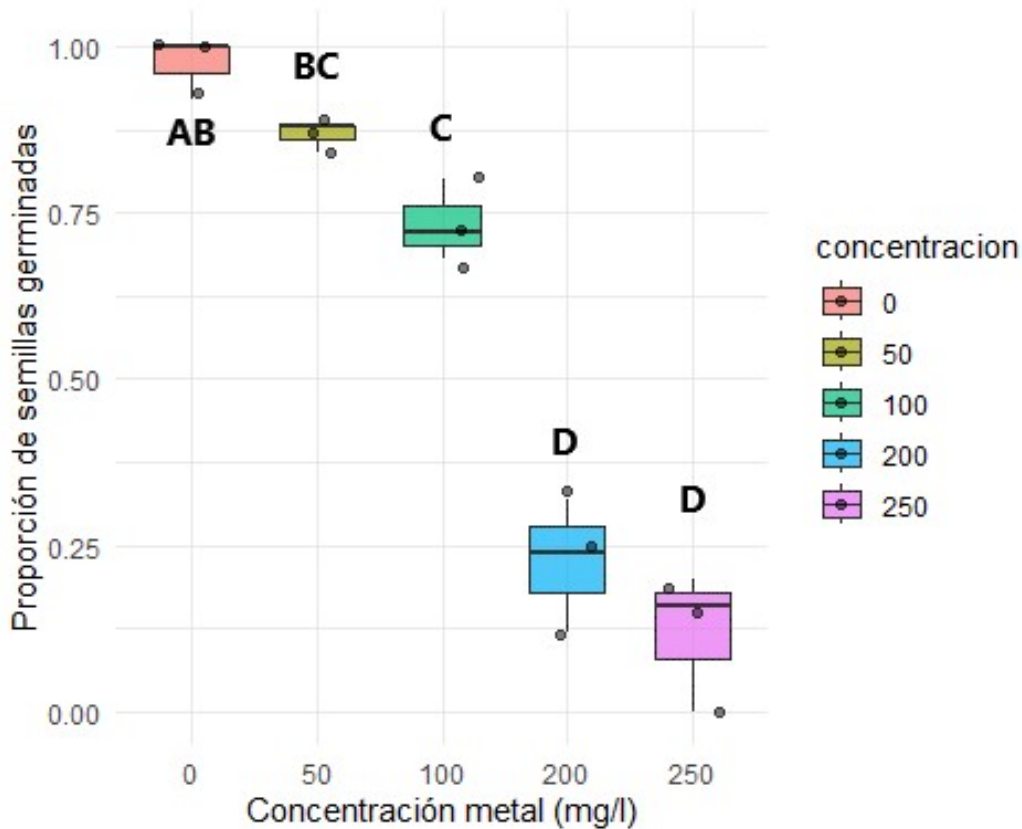


Figura 16. Germinación de semillas de *Festuca arundinacea* a distintas concentraciones de Cu^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

1.5 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre el desarrollo del vástago de *Festuca arundinacea*

Se observó una disminución de la longitud del vástago al aumentar la concentración de metal, con diferencias significativas con respecto al control ($1,567 \pm 0,2388$ cm) a partir de 200 mg/l ($0,807 \pm 0,1052$ cm) ($p < 0,05$), tal como se muestra en la Figura 17 (Tablas A4, apéndice 2).

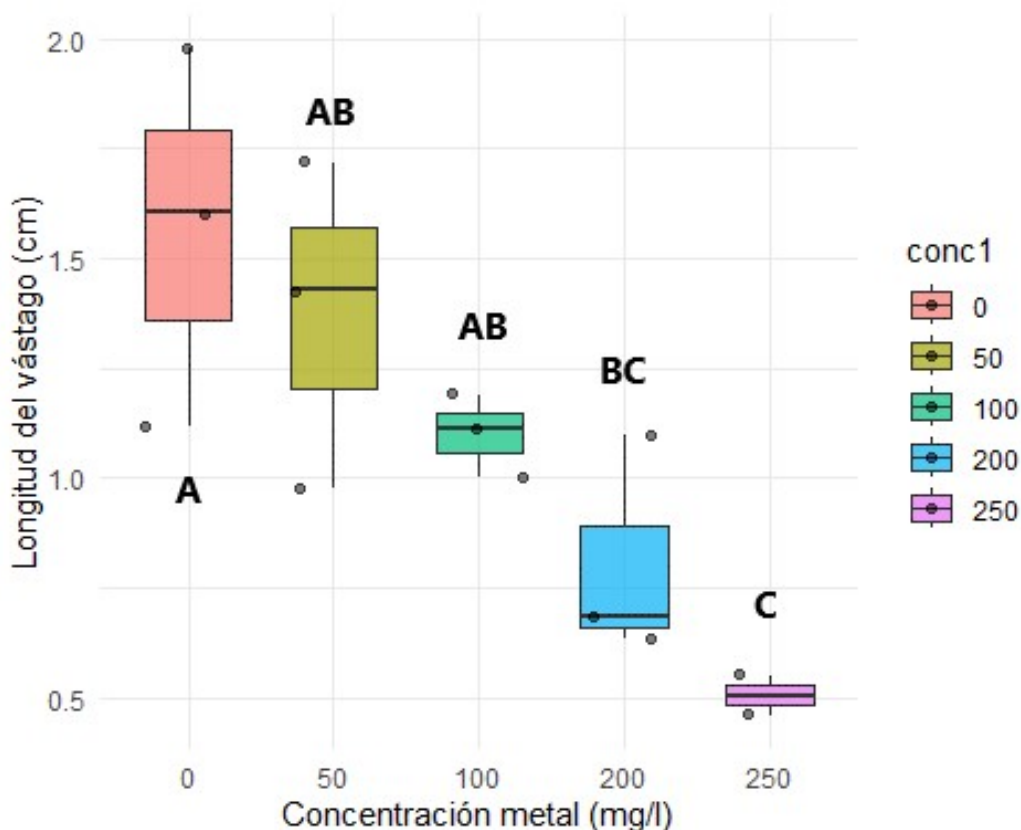


Figura 17. Longitud del vástago de plántulas de *F. arundinacea* a distintas concentraciones de Cu^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

1.6 Estudio del efecto del Cu^{2+} sobre el desarrollo de la raíz de *Festuca arundinacea*

Al analizar el efecto del Cu^{2+} sobre el desarrollo de la raíz, se observó que en todas las réplicas de los tratamientos de 200 mg/l y 250 mg/l las plántulas no desarrollaron raíces en el período de tiempo evaluado en el experimento. Por lo tanto, se excluyeron estos tratamientos en los análisis.

Se observó entonces que para el desarrollo de la raíz hubo diferencias significativas con respecto al control ($1,1547 \pm 0,0806$ cm) a partir de 50 mg/l ($0,0746 \pm 0,0243$ cm), con una clara disminución a mayor concentración de metal ($p < 0,05$) (Figura 18). En los tratamientos de mayor concentración, no hubo crecimiento de la raíz (Tablas A3, apéndice 2).

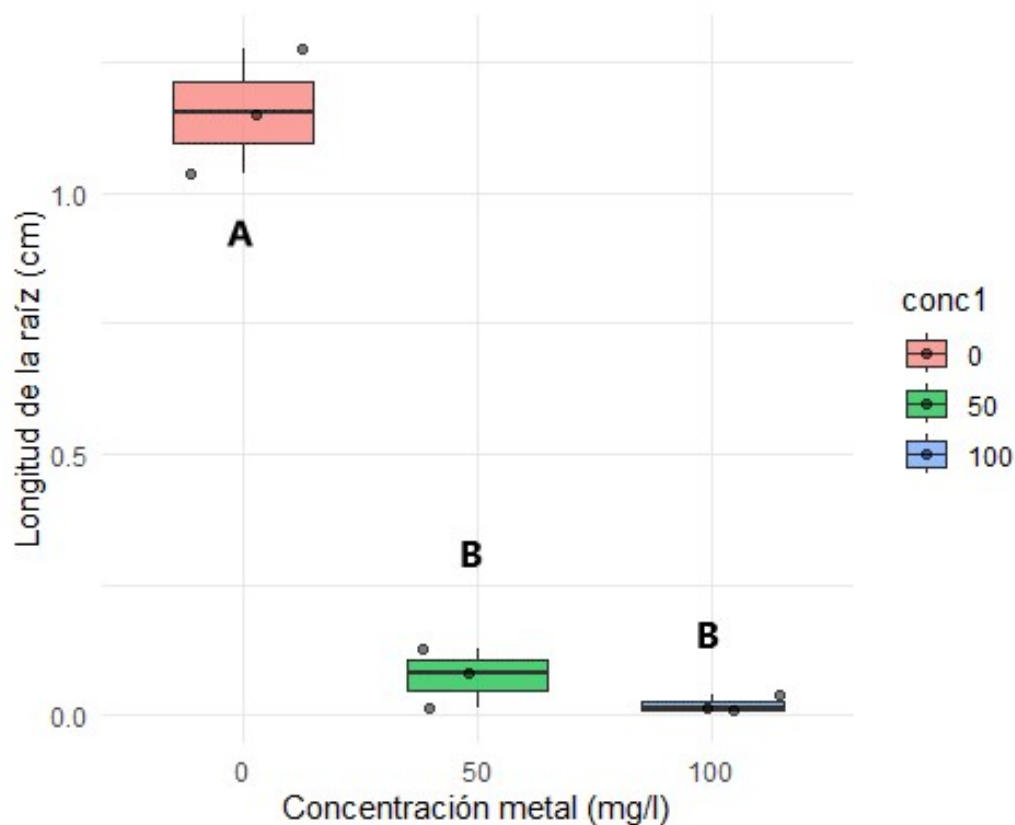


Figura 18. Longitud de la raíz de plántulas de *F. arundinacea* sometidas a distintas concentraciones de Cu^{2+} . Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

2. Selección de actinobacterias tolerantes a metales pesados (Cu^{2+} y Zn^{2+})

Inicialmente se realizó un ensayo en medio sólido en placa de petri, evaluando los efectos de distintas concentraciones de cobre y de zinc sobre el crecimiento de las cepas estudiadas. Como el medio con metal pesado mostró dificultad para agarizar, se decidió ajustar el ensayo y realizar uno en medio ISP2 líquido. A pesar de esta modificación del protocolo, se observó cualitativamente el crecimiento de las actinobacterias estudiadas a 400 mg/l de cobre, ya que a esta concentración el medio había agarizado lo suficiente como para poder analizar las diferencias, y se trataba de una concentración del metal de interés para el

ensayo en planta, ya que el cobre fue el metal que mostró mayor toxicidad en los ensayos de germinación. Se observó que las cepas 31A6TWB2.1 y 44A7TWB1.1 fueron las que presentaron mayor crecimiento en este medio (figura 19).

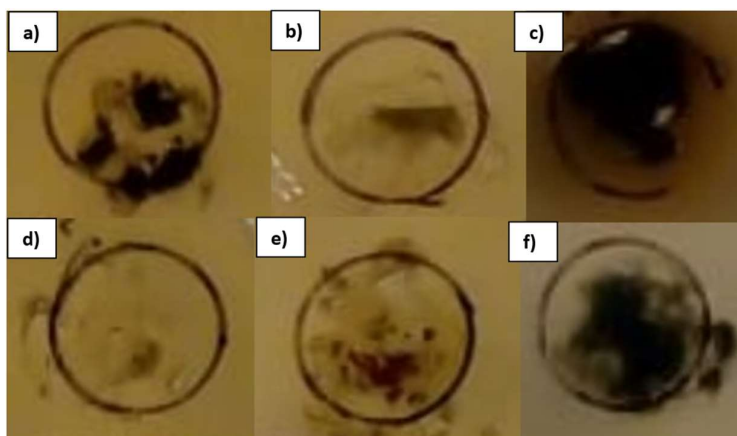


Figura 19. Cepas de actinobacterias sometidas a 400 mg/l de cobre en medio ISP2 agarizado: (a) cepa 11A7GB1 (b) cepa 11A7TWB1 (c) cepa 44A7TWB1.1 (d) cepa 38A7GB2 (e) cepa 13A7SB13 (f) cepa 31A6TWB2.1

Luego se realizaron los ensayos en medio líquido, para luego llevar a cabo una evaluación cualitativa del crecimiento de las actinobacterias estudiadas. Se asignó una escala y se promediaron los resultados de las réplicas realizadas para cada tratamiento, obteniendo los resultados que se detallan en la Tabla 1, en el caso del experimento realizado con Zn^{2+} , y la Tabla 2 en el de Cu^{2+} . Cabe aclarar que en la Tabla 1 se omitió la cepa 11A7GB1, cuyo inóculo original resultó contaminado por un hongo, lo cual implicó la pérdida de las muestras correspondientes.

Concentración metal	Cepa 31A6TWB2.1	Cepa 13A7SB13	Cepa 38A7GB 2	Cepa 44A7TWB1.1	Cepa 11A7TWB1
0 mg/l	+++	+++	++	++	+++
200 mg/l	+	++	++	+++	++
500 mg/l	++	+	+	+	+
1000 mg/l	+	++	+	-	+

2000 mg/l + - - - -

Tabla 1. Estudio cualitativo del crecimiento de las cepas de actinobacterias en medio ISP2 con diferentes concentraciones de Zn^{2+} . (+++) Mucho crecimiento, visible a ojo desnudo. (++) Crecimiento visible pero no tan abundante, actinobacterias sedimentadas en el fondo del tubo. (+) Poco crecimiento, difícilmente visible. (-) Nivel de crecimiento no visible a ojo desnudo

Concentración metal	Cepa 31A6TWB 2.1	Cepa 13A7SB 13	Cepa 38A7G B2	Cepa 44A7TWB 1.1	Cepa 11A7TW B1	Cepa 11A7G B1
0 mg/l	++	+++	+++	++	+++	+++
500 mg/l	+++	+	+	+	+	+
1000 mg/l	+++	++	++	++	+	++
1500 mg/l	++	++	++	++	+	++
2000 mg/l	++	++	++	++	+	++

Tabla 2. Estudio cualitativo del crecimiento de las cepas de actinobacterias en medio ISP2 con diferentes concentraciones de Cu^{2+} . Se resaltan aquellas que fueron seleccionadas para inocular en las plantas. (+++) Mucho crecimiento, visible a ojo desnudo. (++) Crecimiento visible pero no tan abundante, actinobacterias sedimentadas en el fondo del tubo. (+) Poco crecimiento, difícilmente visible. (-) Nivel de crecimiento no visible a ojo desnudo

Se observa en este análisis cualitativo que el crecimiento disminuyó con respecto al control en las mayores concentraciones estudiadas de Zn^{2+} para todas las cepas, llegando en todos los casos a excepción de la cepa 31A6TWB2.1 a no mostrar crecimiento visible a 2000 mg/l de concentración. Por el contrario, en el caso del Cu^{2+} , aunque en algunas cepas mostraron una disminución del crecimiento con respecto al control, en todas ellas se observó crecimiento incluso a la mayor concentración estudiada. A modo de ejemplo, en la Figura 20 se muestran cultivos líquidos en tubo con crecimiento profuso y presencia de micelio aéreo

y esporas en la superficie (fig. 20 c y d), cultivos con crecimiento moderado con micelio visible a ojo desnudo sin formación de esporas en la superficie (fig. 20 b y d), y crecimiento escaso evidenciado únicamente por mayor turbidez en el medio (fig. 20 d).

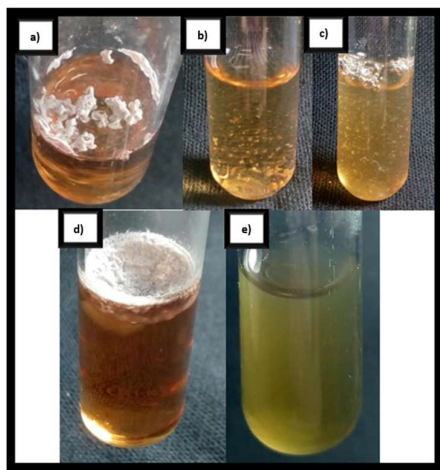


Figura 20. Actinobacterias de tres semanas de crecimiento en medio líquido ISP2 sometidas a estrés por distintas concentraciones de metales pesados y sus respectivos controles: (a) 0 mg/l Zn^{2+} , cepa 44A7TWB1.1 (b) 200 mg/l Zn^{2+} , cepa 44A7TWB1.1 (c) 2000 mg/l Zn^{2+} , cepa 44A7TWB1.1 (d) 0 mg/l Cu^{2+} , 44A7TWB1.1 (e) 500 mg/l Cu^{2+} , 44A7TWB1.1

Se puede observar a partir de este experimento la tolerancia de las seis cepas a concentraciones de hasta 500 mg/l de Zn^{2+} . A concentraciones mayores algunas de las cepas presentaron mayor tolerancia que las otras, como la cepa 31A6TWB2.1, tal como se observa en la tabla 1.

Se observó que las cepas 31A6TWB2.1 y 44A7TWB1.1 no presentaron una disminución de crecimiento con respecto al control en todas las concentraciones de Cu^{2+} evaluadas a excepción de en 500 mg/l para la segunda cepa mencionada (tabla 2). Esta información, complementada con la obtenida en el ensayo en medio sólido, permitió definir que se emplearían estas dos cepas en el ensayo de inoculación en *Festuca arundinacea*.

3. Efecto de la inoculación de las actinobacterias seleccionadas en el desarrollo de *Festuca arundinacea* expuesta a Cu^{2+}

El último experimento consistió en inocular las bacterias seleccionadas en el screening (31A6TWB2.1 y 44A7TWB1.1) en plántulas de *Festuca arundinacea* y dejarlas crecer durante 30 y 37 días en sustrato con Cu^{2+} . (Figura 21 y 22).

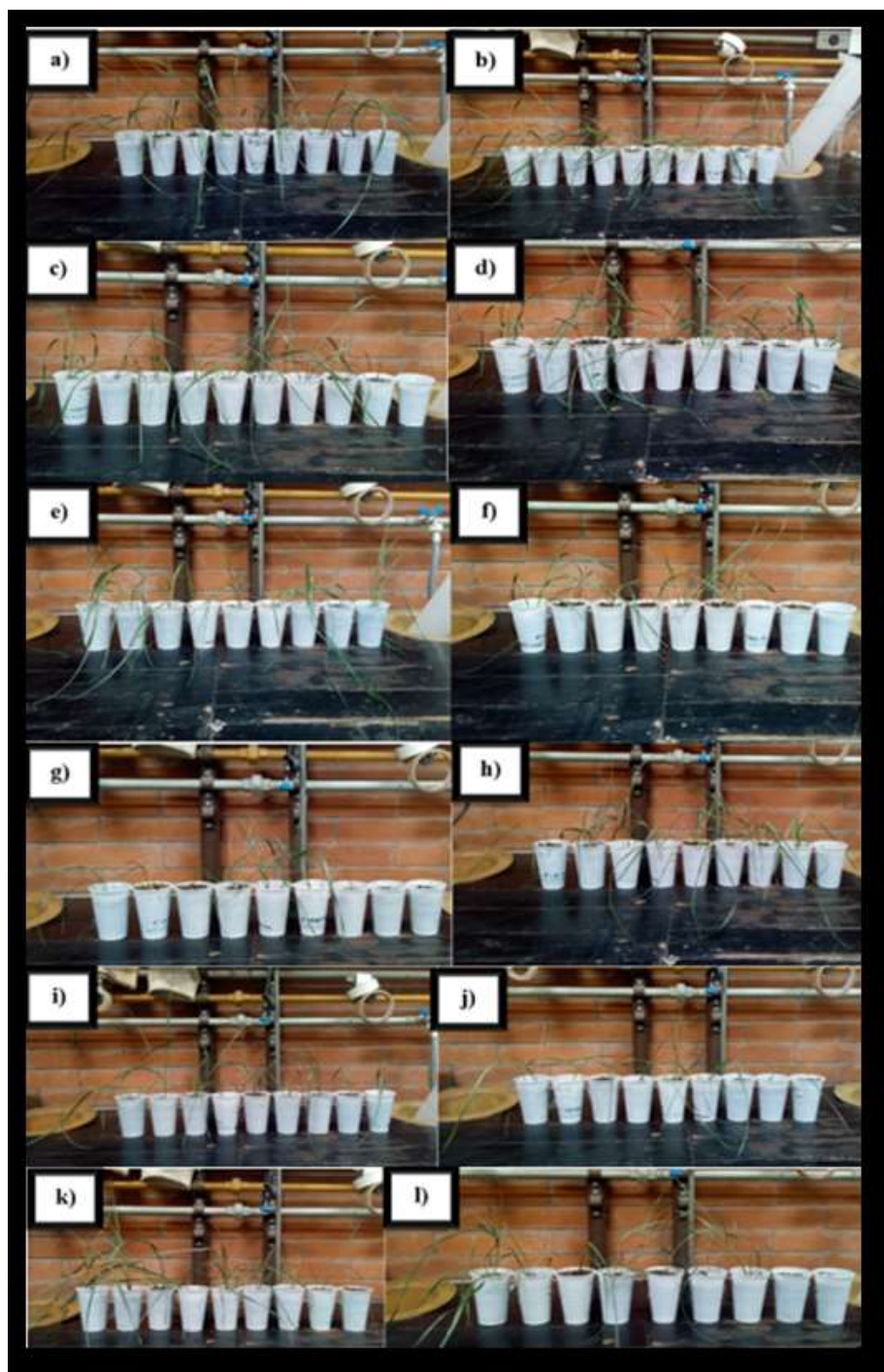


Figura 21. Plantas de *F. arundinacea* de 23 días de crecimiento sometidas a estrés por distintas concentraciones de Cu^{2+} , con inoculación de 31A6TWB2.1 y 44A7TWB1.1 y sin bacteria (B-), y sus respectivos controles: (a) 0 mg/l Cu^{2+} , B- (b) 0 mg/l Cu^{2+} , 31A6TWB2.1 (c) 0 mg/l Cu^{2+} , 44A7TWB1.1 (d) 25 mg/l Cu^{2+} , B- (e) 25 mg/l Cu^{2+} , 31A6TWB2.1 (f) 25 mg/l Cu^{2+} , 44A7TWB1.1 (g) 75 mg/l Cu^{2+} , B- (h) 75 mg/l Cu^{2+} , 31A6TWB2.1 (i)) 75 mg/l Cu^{2+} , 44A7TWB1.1 (j)) 125 mg/l Cu^{2+} , B- (k) 125 mg/l Cu^{2+} , 31A6TWB2.1 (l)) 125 mg/l Cu^{2+} ,

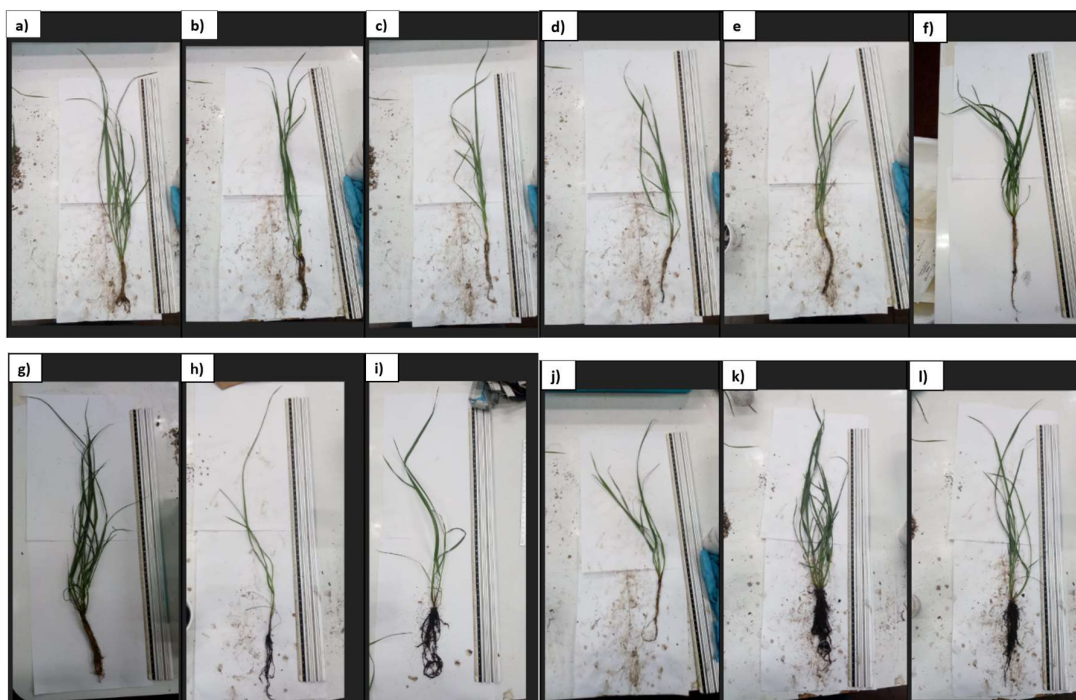


Figura 22. Plantas de *F. arundinacea* de 30 y 37 días (mitad de las réplicas cada edad) al finalizar los tratamientos de Cu^{2+} , con inoculación de 31A6TWB2.1 y 44A7TWB1.1 y sin bacteria (B-), y sus respectivos controles: (a) 0 mg/l Cu^{2+} y B-; (b) 0 mg/l Cu^{2+} y 31A6TWB2.1; (c) 0 mg/l Cu^{2+} y 44A7TWB1.1; (d) 25 mg/l Cu^{2+} y B-; (e) 25 mg/l Cu^{2+} y 31A6TWB2.1; (f) 25 mg/l Cu^{2+} y 44A7TWB1.1; (g) 75 mg/l Cu^{2+} y B-; (h) 75 mg/l Cu^{2+} y 31A6TWB2.1; (i)) 75 mg/l Cu^{2+} y 44A7TWB1.1; (j)) 125 mg/l Cu^{2+} y B-; (k) 125 mg/l Cu^{2+} y 31A6TWB2.1; (l)) 125 mg/l Cu^{2+} y 44A7TWB1.1.

A continuación se mostrarán los resultados de las mediciones de los parámetros de desarrollo con los respectivos análisis estadísticos.

3.1 Supervivencia de las plantas

En primer lugar se estudió el efecto de la aplicación de las bacterias a las plantas sometidas a las diferentes concentraciones de cobre y zinc en la supervivencia de las

mismas. Se pudo observar que para el control sin metal no hubo muertes, pero también se observa que la mayoría de las unidades experimentales sobrevivieron a los tratamientos ($p>0,05$) (Tablas A5, apéndice 2).

Al analizar la supervivencia en función de la inoculación de las bacterias, se observan muertes tanto en el control como en los dos tratamientos (Tabla 3).

Bacteria	Concentración (mg/l)	Total	Supervivientes	Porcentaje (%)
Sin inocular	0	9	9	100.00
Sin inocular	25	9	9	100.00
Sin inocular	75	9	8	88.89
Sin inocular	125	9	8	88.89
31A6TWB2.1	0	9	9	100.00
31A6TWB2.1	25	9	9	100.00
31A6TWB2.1	75	9	8	88.89
31A6TWB2.1	125	9	9	100.00
44A7TWB1.1	0	9	9	100.00
44A7TWB1.1	25	9	6	66.67
44A7TWB1.1	75	9	9	100.00
44A7TWB1.1	125	9	7	77.78

Tabla 3. *Supervivencia (%) de las plantas en función de la inoculación de las bacterias y concentración de cobre y zinc (mg/l). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos.*

3.2 Número de macollos por planta

Se evaluó el efecto de los tratamientos en la cantidad de macollos de las plantas (figura 23).

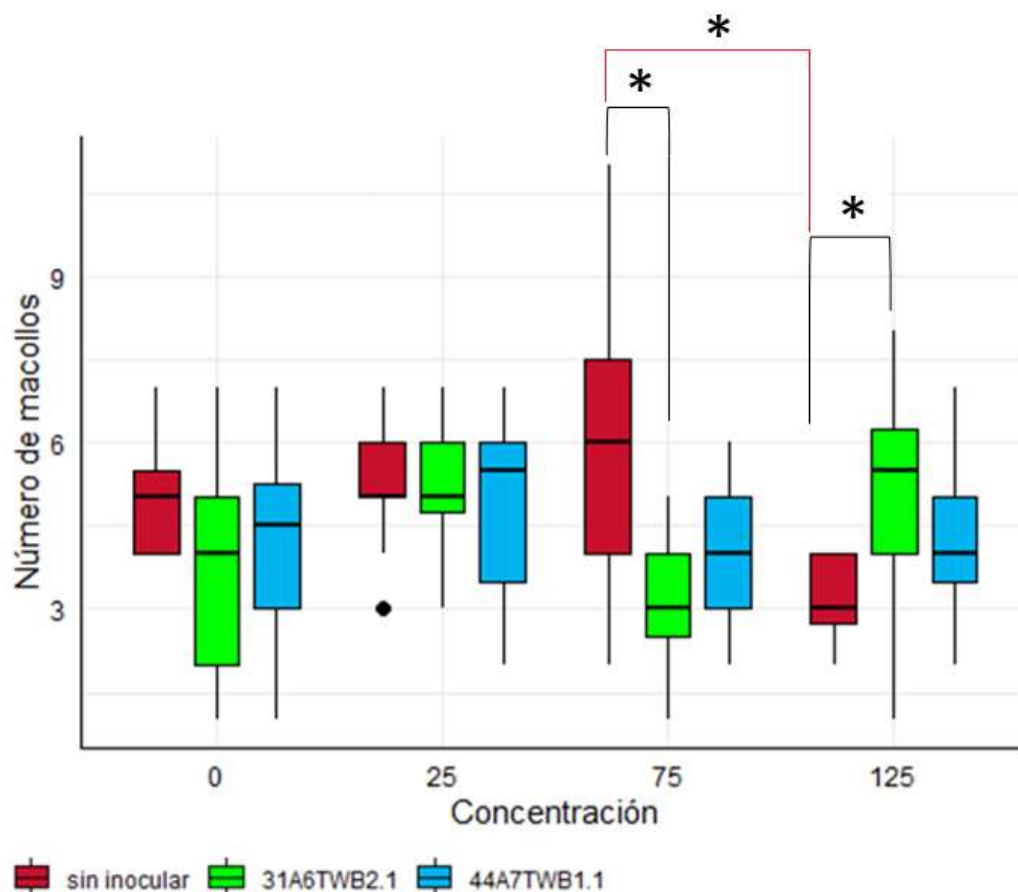


Figura 23. Efecto de los tratamientos en el número de macollos de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

El efecto del zinc sobre el número de macollos varió dependiendo de la concentración de metal y de la inoculación de las bacterias, debido a una interacción significativa entre los factores. El análisis de los datos y los contrastes entre los tratamientos mostró que en las plántulas sin inocular el número de macollos se mantuvo estable en concentraciones de cobre de 25 ($5,350 \pm 0,598$) ($p=0,9726$) y 75 mg/ml ($5,960 \pm 0,711$) ($p=0,7305$). Sin embargo, presentó una disminución significativa en las sometidas a concentración 125 mg/l ($3,120 \pm 0,491$) con respecto a la concentración de 75 mg/l ($p < 0,05$) (Tablas A6, apéndice 2).

Para la concentración de cobre de 75 mg/l se observaron diferencias significativas entre las plantas sin inocular ($5,960 \pm 0,711$) y las inoculadas con 31A6TWB2.1 ($3,16 \pm 0,53$),

disminuyendo el número de macollos en las plantas inoculadas. Para la concentración 125 mg/l las plantas sin inocular presentaron un número significativamente menor de macollos que las plantas inoculadas con 31A6TWB2.1, con $(3,120 \pm 0,491)$ vs. $(5,120 \pm 0,620)$ ($p < 0,05$) (Tablas A6, apéndice 2).

3.3 Número de hojas por planta

Se analizó el efecto de los tratamientos en la cantidad de hojas que presentaron las plantas, lo cual se puede observar en la figura 24.

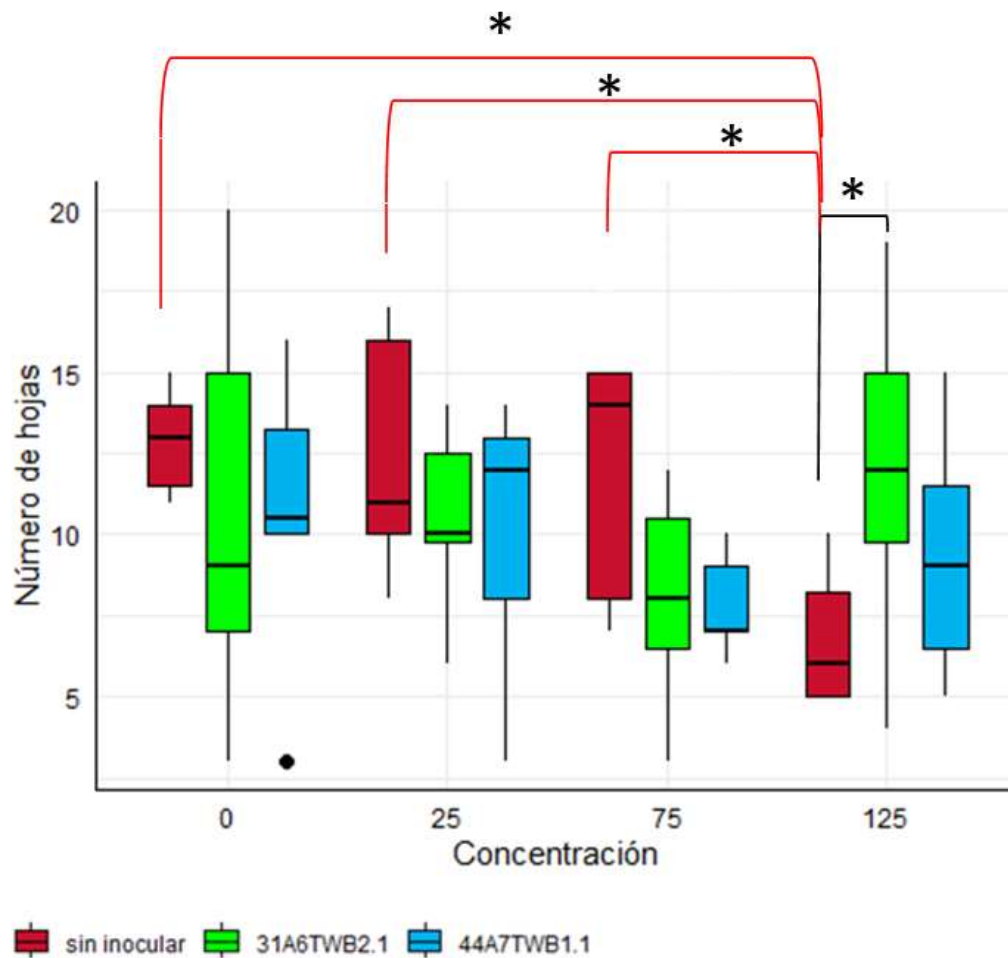


Figura 24. *Efecto de los tratamientos en el número de hojas de las plantas de Festuca arundinacea. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.*

Cuando se llevaron a cabo los contrastes entre tratamientos (Tablas A7, apéndice 2) se vió que para la concentración de 125 mg/l, hubo diferencias significativas entre las plantas sin inocular ($6,750 \pm 0,918$) y las inoculadas con 31A6TWB2.1 ($12,000 \pm 1,224$) ($p < 0,05$). Por lo tanto, hubo una mayor cantidad de hojas en las plantas inoculadas que en aquellas sin inocular bacterias.

Las plantas sin inocular mostraron una disminución significativa en el número de hojas a 125 mg/l ($6,750 \pm 0,918$) con respecto al control sin metal ($12,810 \pm 1,352$) y las demás concentraciones de metal, 25 mg/l ($12,140 \pm 1,163$) y 75 mg/l ($11,67 \pm 1,291$) ($p < 0,05$).

3.4 Longitud del vástago

El efecto del cobre y la inoculación con bacterias sobre la longitud del vástago varió dependiendo de la concentración particular y de la cepa de bacteria inoculada, lo que se reflejó en una interacción significativa de los factores “Bacterias” y “Concentración de cobre” ($p < 0,05$) (Tablas A8, apéndice 2).

Los contrastes entre los niveles de los tratamientos realizados indicaron que en las plantas sin inocular la longitud del vástago disminuyó significativamente respecto al control ($48,80 \pm 2,20$ cm) para concentraciones de cobre de 75 mg/m ($38,20 \pm 2,49$ cm) y 125 mg/ml ($36,70 \pm 2,74$ cm) ($p < 0,05$) (Tablas A8, apéndice 2).

No hubo diferencias significativas entre las plantas inoculadas con bacterias y aquellas sin inocular para ninguna de las concentraciones de metal estudiadas. Sin embargo, se observó una tendencia en las plantas inoculadas sometidas a 125 mg/l a poseer una mayor longitud del vástago que aquellas sin inocular. En particular las inoculadas con la cepa 31A6TWB2 tuvieron vástagos de $46,00 \pm 2,31$ cm, en contraste con aquellas no inoculadas con $36,70 \pm 2,74$ cm (Tablas A8, apéndice 2).

En el caso de plantas inoculadas con 31A6TWB2.1 hay un aumento significativo de la longitud del vástago únicamente entre las sometidas a 75 mg/l ($35,40 \pm 2,82$ cm) y 125

mg/l ($46,00 \pm 2,31$ cm). No hay diferencias significativas entre las inoculadas con 44A7TWB1.1 (figura 25).

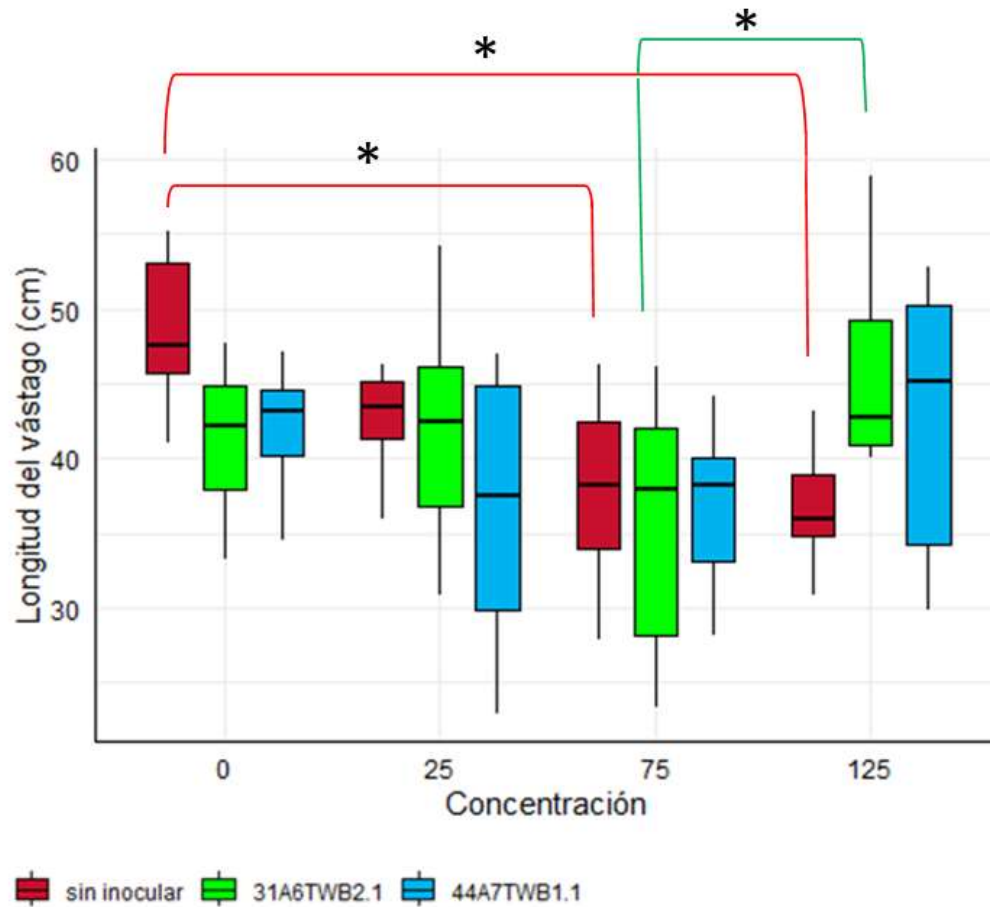


Figura 25. Efecto de los tratamientos en la longitud del vástago de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

3.4 Peso fresco de la raíz

En la figura 26 se muestran los resultados de los análisis de los valores de peso fresco de la raíz de las plantas estudiadas.

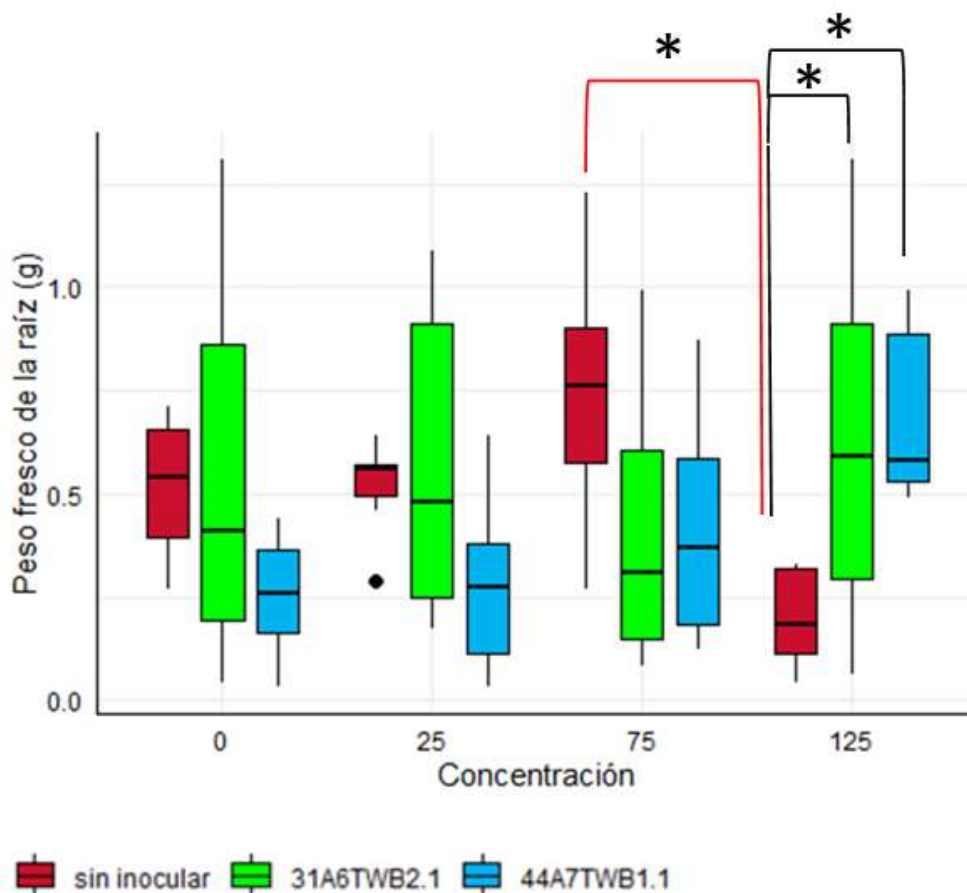


Figura 26. Efecto de los tratamientos en el peso fresco de la raíz de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

A la mayor concentración de metal evaluada (125 mg/l) el peso fresco de la raíz de las plantas fue significativamente menor ($p < 0,05$) cuando no se les inoculó bacterias ($0,1990 \pm 0,1022$ g) que al inocular 31A6TWB2.1 ($0,6270 \pm 0,1180$ g) y 44A7TWB1.1 ($0,6900 \pm 0,1093$ g) (Tablas A9, apéndice 2).

Al analizar las plantas sin inocular el peso fresco de la raíz de aquellas que fueron sometidas a la mayor concentración de metal (125 mg/l) mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) ($0,1990 \pm 0,1022$ g) con respecto a las sometidas a 75 mg/l de cobre ($0,7670 \pm 0,1184$ g) (Tablas A9, apéndice 2).

3.5 Peso seco de la raíz

Los efectos de los tratamientos en el peso seco de la raíz se pueden analizar a partir de la figura 27.

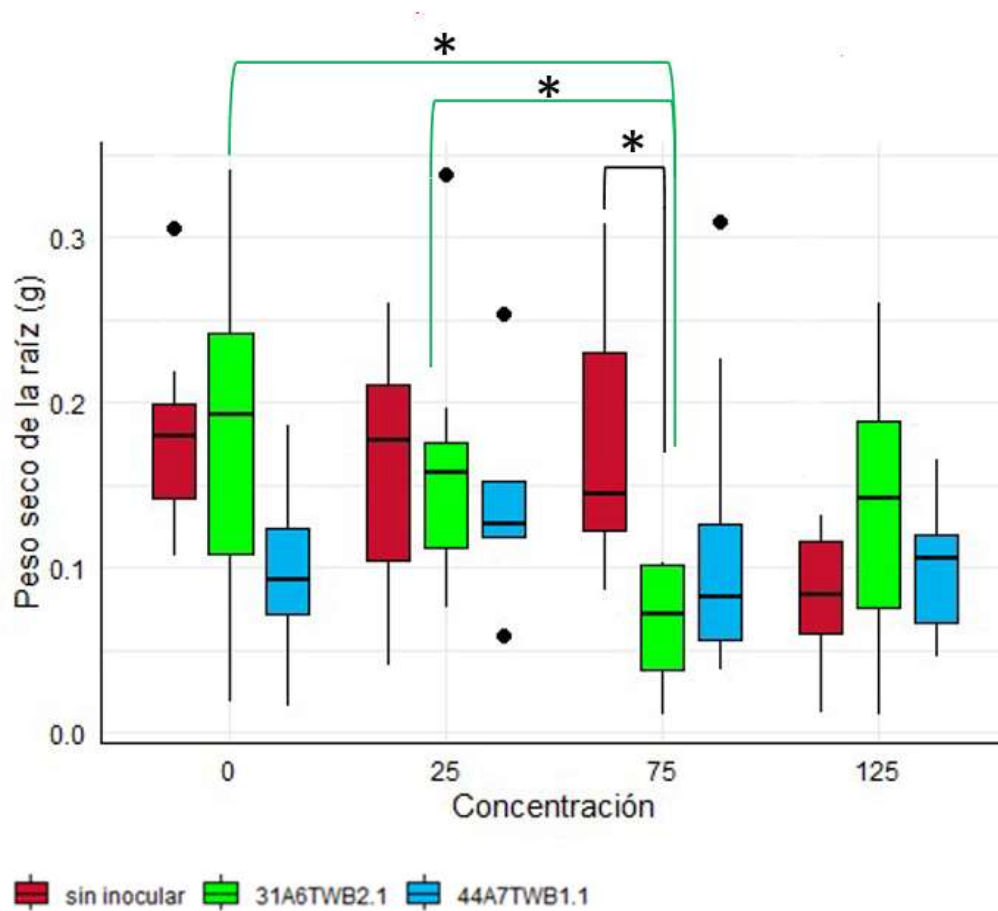


Figura 27. Efecto de los tratamientos en el peso seco de la raíz de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

Para las plantas sometidas a 75 mg/l el peso seco de la raíz fue significativamente

menor ($p < 0,05$) al inocularse con 31A6TWB2.1 que al no ser inoculadas ($0,1750 \pm 0,0350$ g). Para ninguna de las demás concentraciones de metal se observó que hubiera diferencias significativas entre no inocular e inocular a las plantas ($p < 0,05$) (Tablas A10, apéndice 2).

Para las plantas que no fueron inoculadas con bacterias no disminuyó significativamente ($p < 0,05$) el peso seco de la raíz a la mayor concentración evaluada con respecto a las plantas a las cuales no se les agregó cobre. Sin embargo, sí se observó una tendencia a disminuir de las medias ($0,0814 \pm 0,0336$ g vs $0,1788 \pm 0,0350$ g) (Tablas A10, apéndice 2).

Analizando las plantas inoculadas con 31A6TWB2.1, se pudo observar que el peso de las sometidas a 75 mg/l de cobre ($0,0696 \pm 0,0350$ g) disminuyó significativamente con respecto a las plantas del control ($0,1777 \pm 0,0337$ g) y respecto a las de 25 mg/l ($0,1674 \pm 0,0337$ g) ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre las inoculadas con 44A7TWB1.1 ($p > 0,05$) (Tablas A10, apéndice 2).

3.6 Peso fresco del vástago

Se observan en la figura 28 los efectos de los tratamientos en el peso fresco del vástago de las plantas.

Para las plantas no inoculadas, el peso disminuyó para las plantas sometidas a la mayor concentración de cobre evaluada, 125 mg/l, ($0,225 \pm 0,128$ g) con respecto a las del control sin metal ($0,563 \pm 0,134$ g) y a todas las demás concentraciones evaluadas, es decir, 25 mg/l ($0,521 \pm 0,126$ g) y 75 mg/l ($0,592 \pm 0,131$ g) ($p > 0,05$). Por otro lado, no hubo diferencias entre los tratamientos con distinta concentración de cobre para las plantas inoculadas con las bacterias estudiadas ($p > 0,05$) (Tablas A11, apéndice 2).

Al inocular las plantas con las bacterias 44A7TWB1.1, el peso fresco del vástago disminuyó ($p < 0,05$) con respecto a las plantas no inoculadas al estar sometidas a 75 mg/l de cobre. Las plantas control sin bacteria mostraron $0,592 \pm 0,131$ g de peso fresco del vástago, mientras que las inoculadas con la bacteria 44A7TWB1.1 presentaron $0,315 \pm 0,126$ g. Por el contrario, la inoculación de la bacteria 31A6TWB2.1 en las plantas sometidas a 125 mg/l de cobre generó un aumento del peso fresco del vástago, con $0,538 \pm 0,128$ g de las plantas inoculadas vs $0,225 \pm 0,128$ g de las plantas sin inocular ($p < 0,05$) (Tablas A11, apéndice 2).

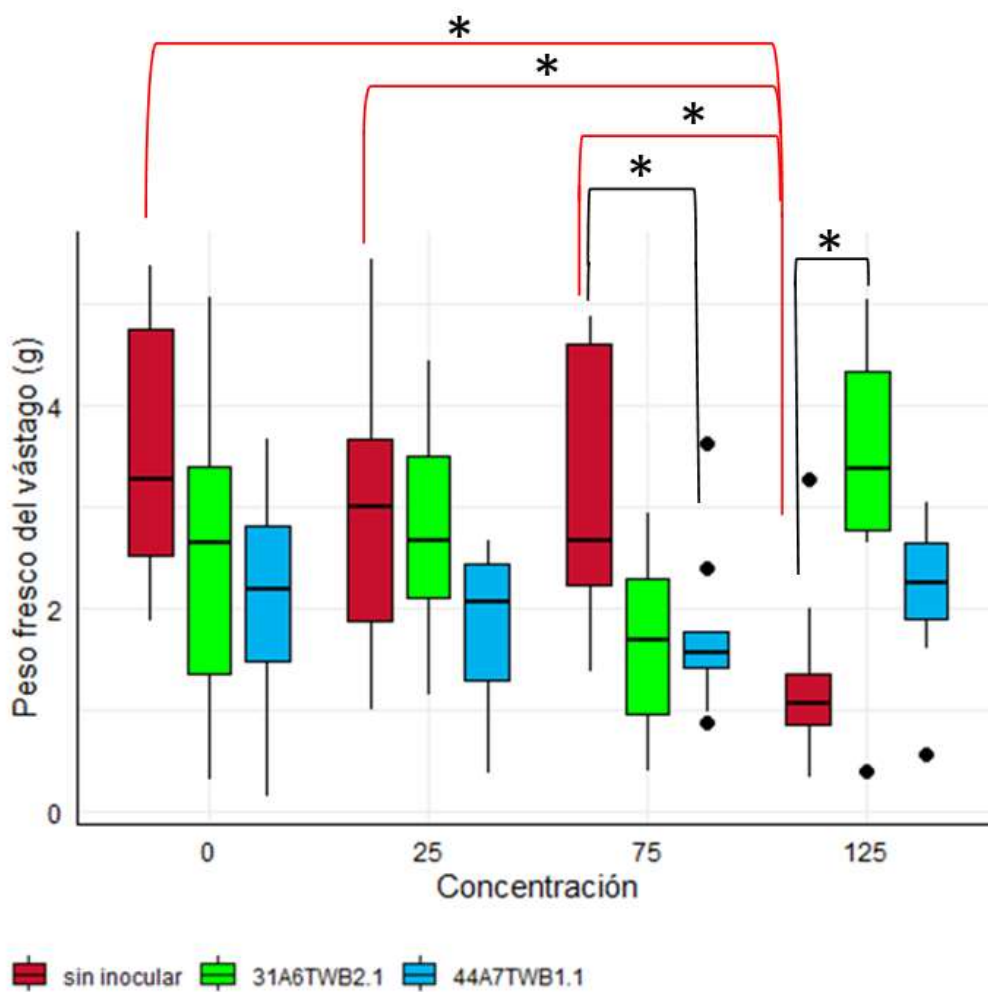


Figura 28. Efecto de los tratamientos en el peso fresco del vástago de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

3.7 Peso seco del vástago

Los efectos de los tratamientos en el peso seco del vástago de las plantas se pueden observar en la figura 29.

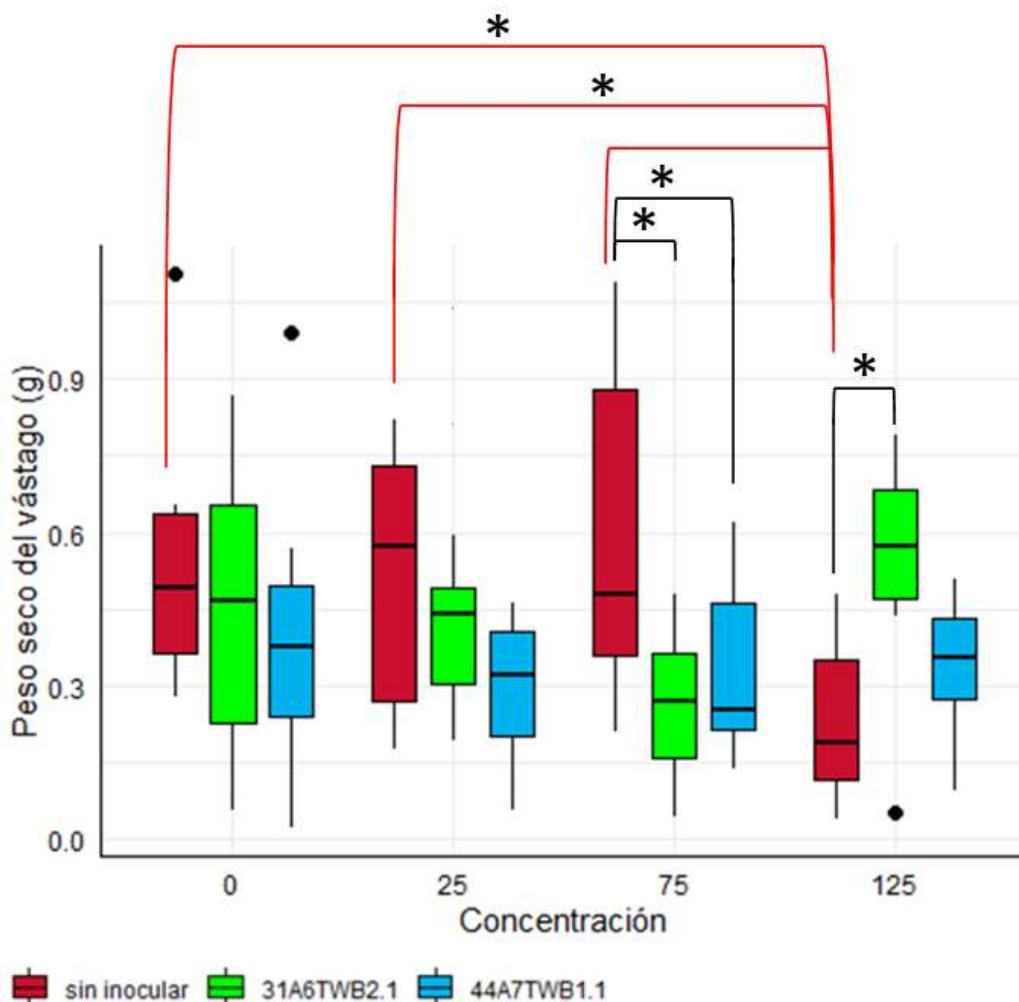


Figura 29. Efecto de los tratamientos en el peso seco del vástago de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

El peso seco del vástago de las plantas que no fueron inoculadas disminuyó al someterlas a la mayor concentración de metal estudiada, 125 mg/l de Cu^{2+} ($0,225 \pm 0,128$ g), con respecto a las plantas sometidas a todas las demás concentraciones evaluadas y el control sin metal. El control sin metal tuvo $0,563 \pm 0,134$ g de peso seco del vástago, las tratadas con 25 mg/l $0,521 \pm 0,126$ g y las tratadas con 75 mg/l $0,592 \pm 0,131$ g ($p < 0,05$). Por el contrario, no hubo diferencias entre los tratamientos con distinta concentración de cobre para las plantas inoculadas con las bacterias estudiadas ($p > 0,05$) (Tablas A12, apéndice 2).

Al someter a las plantas a 75 mg/l de metal las plantas inoculadas con las actinobacterias 31A6TWB2.1 ($0,277 \pm 0,131$ g) y 44A7TWB1.1 ($0,315 \pm 0,126$ g) tuvieron un peso seco del vástago significativamente menor que el de las plantas sin inocular ($0,592 \pm$

0,131 g) ($p < 0,05$). En cambio, para las plantas sometidas a 125 mg/l el peso seco del vástago aumentó significativamente con respecto a las plantas sin inocular ($0,225 \pm 0,128$ g) en las inoculadas con una de las bacterias estudiadas ($0,538 \pm 0,128$ g las inoculadas con 31A6TWB2.1) ($p < 0,05$).

3.8 Peso fresco de la planta completa

Se observaron los efectos de los tratamientos sobre el peso fresco de la planta completa (figura 30).

Las plantas no inoculadas con bacteria mostraron una disminución significativa a la mayor concentración de cobre, 125 mg/l ($1,48 \pm 0,673$ g), con respecto a las que no se les agregó el metal pesado y las sometidas a todas las demás concentraciones (a 75 mg/l pesaron $4,03 \pm 0,673$ g, a 25 mg/l pesaron $3,55 \pm 0,654$ g y sin metal pesaron $4,22 \pm 0,673$ g) ($p < 0,05$) (Tablas A13, apéndice 2).

Al inocular las plantas con 31A6TWB2.1 el peso fresco de las plantas a las que se les aplicó la mayor concentración de cobre de cobre (125 mg/l) aumentó significativamente ($4,20 \pm 0,673$ g) con respecto a las inoculadas con la misma bacteria sometidas a 75 mg/l de cobre ($2,120 \pm 0,696$ g) ($p < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre las plantas inoculadas con 44A7TWB1.1 a las que se les aplicó distintas concentraciones de cobre ($p > 0,05$) (Tablas A13, apéndice 2).

Para las plantas que no estuvieron sometidas al metal, disminuyó el peso fresco de aquellas que fueron inoculadas con una de las bacterias, la 44A7TWB1.1 ($2,38 \pm 0,673$ g) con respecto a las plantas del control sin inocular ($4,220 \pm 0,673$ g) ($p < 0,05$) (Tablas A13, apéndice 2).

Las plantas expuestas a 75 mg/l también las inoculadas con las bacterias 31A6TWB2.1 mostraron una disminución del peso con respecto a las plantas sin inocular. Para las no inoculadas el peso fresco fue de $4,030 \pm 0,673$ g, mientras que el de las inoculadas con 31A6TWB2.1 fue $2,120 \pm 0,696$ g ($p < 0,05$) (Tablas A13, apéndice 2).

Por el contrario, para la concentración 125 mg/l, las plantas inoculadas con una de las dos bacterias, la 31A6TWB2.1 tuvieron un peso fresco significativamente mayor que las que no fueron inoculadas ($4,200 \pm 0,673$ g vs $1,480 \pm 0,673$ g) ($p < 0,05$) (Tablas A13, apéndice 2).

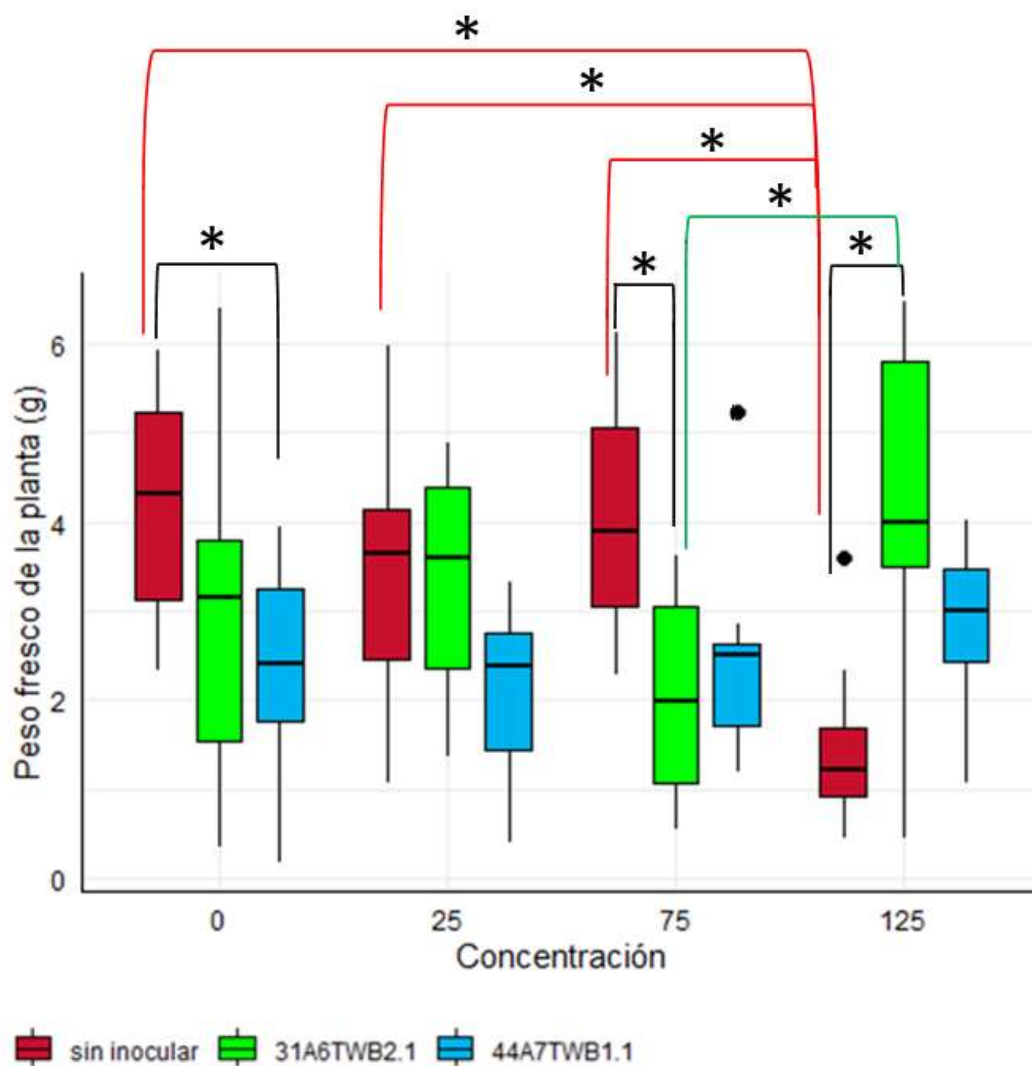


Figura 30. Efecto de los tratamientos en el peso fresco de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

3.9 Peso seco de la planta completa

Se estudió el efecto sobre los tratamientos en el peso seco de la planta completa, tal como se observa en la figura 31.

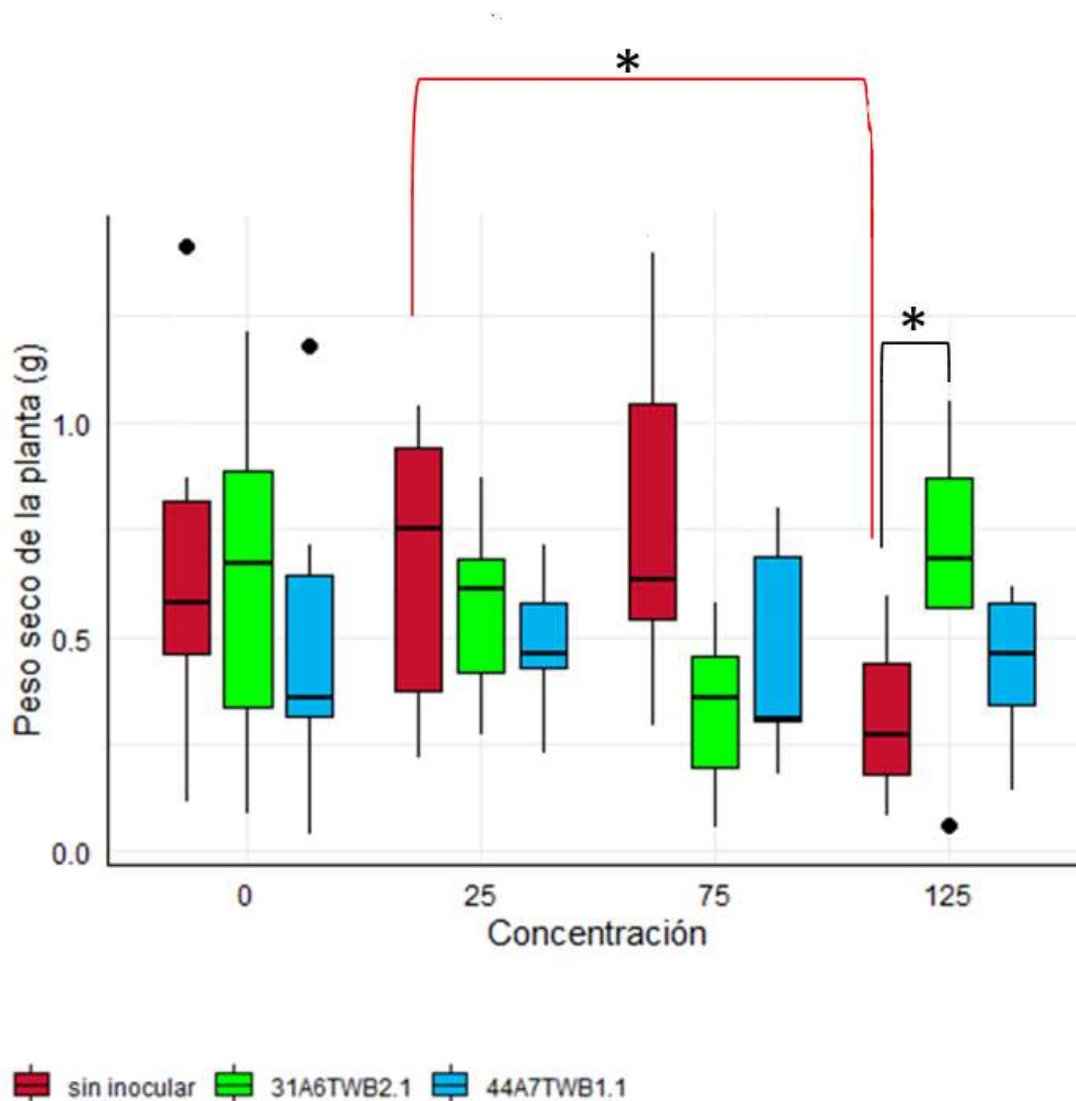


Figura 31. Efecto de los tratamientos en el peso seco de las plantas de *Festuca arundinacea*. Los asteriscos muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos.

Al someter a las plantas a la mayor concentración de metal, las que no fueron inoculadas ($0,312 \pm 0,134$ g) tuvieron un peso seco significativamente menor que aquellas que fueron inoculadas con una de las dos bacterias, la 31A6TWB2.1 ($0,602 \pm 0,157$ g) ($p < 0,05$) (Tablas A14, apéndice 2).

Las plantas sin inocular sometidas a la concentración más elevada, 125 mg/l de cobre ($0,312 \pm 0,134$ g) disminuyeron significativamente su peso seco con respecto a ($p < 0,05$) las sometidas a 25 mg/l ($0,633 \pm 0,153$ g) ($p < 0,05$).

Las plantas inoculadas con 31A6TWB2.1 aumentaron significativamente su peso seco al someterlas a 125 mg/l del metal pesado ($0,695 \pm 0,162$ g) ($p < 0,05$), con respecto a aquellas sometidas a una concentración menor de metal pesado, de 75 mg/l ($0,364 \pm 0,138$ g). Las plantas inoculadas con 44A7TWB1.1 no mostraron diferencias significativas entre los niveles de concentración de cobre ($p > 0,05$).

3.10 Aislamiento de las bacterias en plantas inoculadas

Finalmente, se re-aislaron las actinobacterias estudiadas en las plantas inoculadas. Los mismos morfotipos de las actinobacterias inoculadas (observados a ojo desnudo y al microscopio) lograron ser re-aislados tanto como microorganismos asociados al rizoplasma (sin esterilizar superficialmente las raíces), como endófitos a partir de raíces superficialmente esterilizadas de *Festuca arundinacea*. En las Figuras 32 y 33 se muestran las imágenes de los morfotipos aislados.

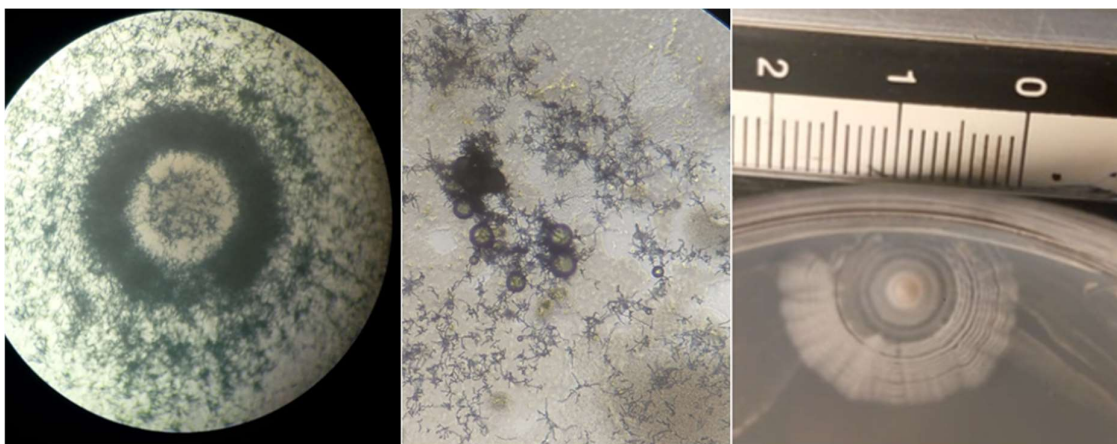


Figura 32. Cepa 44A7TWB1.1 aislada de las raíces de las plantas inoculadas al finalizar el experimento con *F. arundinacea* inoculada y sometida a estrés por Cu^{2+} . Imagen izquierda aumento 40X, centro aumento 100X, derecha vista a ojo desnudo

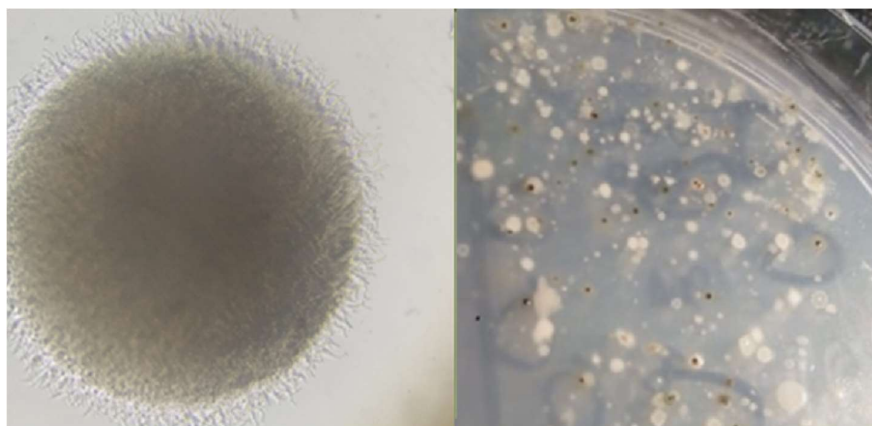


Figura 33. Cepa 31A6TWB2.1 aislada de las raíces de las plantas inoculadas al finalizar el experimento con *F. arundinacea* inoculada y sometida a estrés por Cu^{2+} . Imágen izquierda 40 X, derecha vista a ojo desnudo.

Discusión

La contaminación del suelo por exceso de metales pesados es una problemática de interés, que puede ser afrontada mediante la fitorremediación. La asociación de actinobacterias endofíticas a plantas con capacidades fitorremediadoras es una estrategia prometedora, que fue abordada en el presente trabajo, cuyo objetivo fue estudiar los aspectos biológicos de las asociaciones entre la gramínea forrajera *Festuca arundinacea* y actinobacterias endofíticas, evaluando su impacto en la tolerancia frente al estrés por un metal pesado (Cu^{2+} o Zn^{2+}).

Al estudiar los efectos del zinc y del cobre en la germinación de *Festuca arundinacea*, se pudo observar que ambos metales mostraron efectos negativos en la germinación y desarrollo, que aumentaron al incrementar la concentración del metal pesado. Además, se observó que el zinc mostró efectos negativos en la germinación a concentraciones más elevadas que el cobre. Estos resultados confirmaron lo propuesto en la primera hipótesis del presente trabajo, correspondiente al objetivo 1. En esta hipótesis se postuló que *Festuca arundinacea* presenta distinta tolerancia a la presencia de Cu^{2+} y/o Zn^{2+} que afectan su germinación y desarrollo, según la concentración a la cual se exponen las semillas, y que a medida que se incrementa la concentración de los metales disminuye el crecimiento y la germinación de las plantas.

La disminución observada de la germinación y crecimiento de *Festuca arundinacea* a partir de cierto umbral de concentración es consistente con los efectos ya descritos de los dos metales estudiados sobre las plantas. Ambos son micronutrientes que a concentraciones bajas son necesarios para la planta, y no causarían daños a la misma, pero a concentraciones más elevadas empiezan a presentar toxicidad (Gupta et al., 1979; Amezcua-Romero & Lara-Flores, 2017). Al tratarse de una especie que presenta mecanismos que le permiten acumular concentraciones de metales pesados superiores a otras gramíneas (Khashij et al., 2018), fue relevante determinar el umbral al cual los metales elegidos comenzaban a tener efectos en la germinación y desarrollo de las plantas. Aunque existen estudios previos en los cuales se analizaron los efectos del cobre y el zinc en suelos con *Festuca arundinacea*, en el presente trabajo se pudo ajustar un protocolo en placa de Petri en el que se pudieron observar únicamente los efectos de los metales de interés, a diferencia de un protocolo en tierra en el que intervienen otros factores en el desarrollo de la planta y las propiedades del suelo y los microorganismos presentes que interactúan con la planta afectan la biodisponibilidad del metal (Kumar et al., 2016).

Se han realizado estudios similares al llevado a cabo en el presente trabajo, en otras especies de plantas tales como *Allium cepa* L. (Ogeleka y Nwudu, 2019) y *Brassica napus* L., cv. *Westar* (Ivanova et al., 2010). En estos trabajos se ha observado también mayores efectos de toxicidad del cobre con respecto al zinc sobre las plantas. Estos estudios no han arribado a conclusiones sobre las posibles razones de esta tendencia, a pesar de haber analizado parámetros involucrados con los mecanismos de toxicidad de los metales, tales como el contenido de pigmentos fotosintéticos y tasa de peroxidación lipídica en el caso del trabajo de Ivanova et al., 2010. Sin embargo, cabe aclarar que en el trabajo realizado con *Brassica napus* se observaron diferencias en el transporte de ambos metales en las plantas, siendo el zinc mucho más móvil que el cobre (Ivanova et al., 2010), tendiendo el cobre a acumularse en las raíces sin traslocar a los brotes (Marschner, 1995). Además, el daño causado por el cobre fue significativamente mayor que el causado por el zinc para las raíces de las plantas (Ivanova et al., 2010). En el presente trabajo los efectos negativos sobre las plantas para ambos metales se observaron a las menores concentraciones de metal evaluadas, y las plantas sometidas a las concentraciones más elevadas que se probaron no evidenciaron presencia de raíces. Por ello sería interesante evaluar si las diferencias de transporte de ambos metales pudieran estar causando que la menor movilidad del cobre concentre sus efectos en esta parte de la planta, y que esto estuviese generando mayores daños en su desarrollo que si presentara más movilidad. En el trabajo desarrollado en *Brassica napus* no se observaron correlaciones significativas entre el grado de toxicidad del cobre y el zinc y su acumulación en los órganos de colza en comparación con el control, y

se sugiere que la diferencia de toxicidad podría deberse al papel que cumple el cobre en puntos cruciales del metabolismo (Ivanova et al., 2010). Sin embargo, en *F. arundinacea* no se ha evaluado si la distribución y transporte de los metales tiene un rol significativo en la toxicidad diferencial que presentan.

Luego, al estudiar las actinobacterias endofíticas, promotoras de crecimiento de interés para ser utilizadas como potenciales biorremediadores de metales pesados, se pudo observar que algunas de las cepas toleraron tanto cobre como zinc en todas las concentraciones evaluadas, mientras que otras no mostraron crecimiento considerable a las concentraciones más elevadas de metal. Tal como se indicó en el objetivo 2 de este trabajo, así como se propuso en la segunda hipótesis, se esperaba que las actinobacterias mostraran sensibilidad diferencial a los metales estudiados, pudiendo seleccionar al menos una cepa metalotolerante. Esto se condice con que numerosas cepas de actinobacterias han mostrado tener mecanismos que les permiten tolerar el estrés causado por los metales pesados (Le Vo et al., 2022). Los resultados obtenidos permitieron no rechazar esta hipótesis, que enuncia que las actinobacterias endófitas aisladas de *B. auleticus* presentan sensibilidad diferencial a Cu^{2+} y Zn^{2+} y que se esperaba seleccionar al menos una cepa metalotolerante. Efectivamente, hemos encontrado que las seis actinobacterias PGP endófitas estudiadas son metalotolerantes (incluso la que tolera menos concentración de metal llegó a tolerar hasta 500 mg/l de zinc, y la más tolerante hasta 2000 mg/l de zinc, y todas ellas mostraron tolerancia al cobre hasta concentraciones de 2000 mg/l). Pese a haber seleccionado 2 cepas para continuar el estudio de los siguientes objetivos, cabe destacar que, como las demás cepas evaluadas también mostraron metalotolerancia, sería interesante incluirlas en estudios posteriores con las mismas en proyectos de biorremediación.

Al comparar la tolerancia de las actinobacterias con la de las plantas, en función de lo propuesto en el tercer objetivo del trabajo, se logró observar que estas últimas fueron mucho más sensibles a los metales pesados que las bacterias. Las bacterias toleraron ambos metales a concentraciones de hasta 1000 mg/l de zinc y 2000 mg/l de cobre, mientras que las plantas mostraron efectos negativos en su desarrollo con concentraciones de 50 mg/l. Las cepas metalotolerantes seleccionadas fueron 31A6TWB2.1 (*Micromonospora halotolerans*) y 44A7TWB1.1 (*Streptomyces* sp.). Existen variados estudios de diferentes cepas del género *Streptomyces* que tienen capacidad de biorremediación de metales pesados, habiendo sido descritas en detalle las características moleculares de sus paredes que les confieren la capacidad de biosorción de los metales (Mosbah y Sahmoune, 2013). Asimismo, estudios recientes de cepas endofíticas del género *Micromonospora* mostraron que estas actinobacterias cuentan con genes de producción de metalóforos, siendo capaces

de sintetizar *in vitro* quelantes de distintos metales pesados incluyendo tanto zinc como cobre. Además, la inoculación con estas cepas tuvo un efecto positivo en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* promoviendo su tolerancia a los metales pesados como una forma de promoción de crecimiento (Ortuzar et al., 2020). Este antecedente reafirma el interés sobre el estudio del género *Micromonospora*, en particular de la cepa 31A6TWB2.1 como potencial remediadora de metales pesados.

Se pudo estudiar el efecto de la inoculación de las actinobacterias en el desarrollo vegetal de *F. arundinacea* bajo distintas concentraciones de cobre, comprobando al finalizar los ensayos que las plantas fueron colonizadas por las actinobacterias. Se lograron re-aislar colonias de las actinobacterias inoculadas dentro de las raíces de *F. arundinacea*, confirmando su carácter endófito y verificando la tercera hipótesis derivada del objetivo 3 (*Festuca arundinacea* es susceptible a ser colonizada por actinobacterias PGP endófitas de *Bromus auleticus*).

A partir de los ensayos de inoculación en plántulas se observó que el impacto de las bacterias sobre las plantas variaba según la concentración de metal. Se vio que en concentraciones más bajas (0-75 mg/l de cobre) la presencia de las bacterias ocasionó un efecto negativo sobre los parámetros de crecimiento vegetal medidos. Es importante recalcar que a bajas concentraciones, el cobre es utilizado por los organismos como micronutriente, por lo que es esperable que las plantas tengan un desarrollo óptimo en esas concentraciones. Por su parte, el efecto observado en plántulas inoculadas a baja concentración de Cu^{2+} , podría deberse a que el costo del establecimiento de la asociación planta-actinobacteria podría ser mayor a los beneficios posibles que este vínculo le suponga a la planta en su desarrollo en condiciones en las cuales no se encuentra sometida a un estrés. Sin embargo, al aparecer una condición estresante, como es una concentración de 125 mg/l de cobre, estos efectos negativos se revierten y se podría inferir que los beneficios otorgados por la asociación de las actinobacterias endófitas son mayores que el costo de mantener dicha asociación, contribuyendo así a mejorar el desarrollo de la planta bajo estrés.

Particularmente, con la inoculación con la cepa 31A6TWB2.1 en *F. arundinacea* sometida a la condición más alta de cobre, se observó un incremento en la mayoría de los parámetros vegetales estudiados (número de macollos, número de hojas, longitud del vástago, peso fresco de raíz y vástago, peso seco del vástago, peso fresco y peso seco total) respecto a las menores concentraciones. Estos resultados verifican la hipótesis del objetivo 3, que indica que se espera que la inoculación de las bacterias promueva la mejora del crecimiento vegetal en presencia de metales pesados. Existe un estudio previo en el que *Festuca arundinacea* fue inoculada con rizobacterias (cepas obtenidas del suelo rizosférico

de *F. arundinacea* cultivada en el relave de minas de oro) para llevar a cabo ensayos de fitorremediación asistida por microorganismos, que mejoraron su tasa de germinación, altura, absorción de metales pesados, contenido de nutrientes y actividad enzimática de las plantas (Chen et al., 2023). Aunque en esta tesis no se analizaron estos parámetros en las plantas se podría pensar que uno de los mecanismos por los cuales se obtuvieron mejores parámetros vegetales en las plantas inoculadas con *Micromonospora* podría ser una incrementada acumulación de metales acompañada de mayor contenido nutricional y enzimático en las plantas hospedantes.

Por otro lado, los efectos de la inoculación de la cepa de *Streptomyces* (44A7TWB11) no mostraron resultados contundentes en las concentraciones de metal estudiadas. Si bien se observó que el peso fresco de la raíz incrementó con la inoculación, el resto de los parámetros sólo presentaron una tendencia al incremento con la cepa. Pese a esto, estudios previos realizados con especies de *Streptomyces* han mostrado un gran potencial en la biorremediación de metales pesados por su capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de los mismos (Timková et al., 2018). Probablemente, para poder observar incrementos significativos, es necesario no solo evaluar distintas concentraciones de metales pesados, sino también distintas concentraciones de bacterias, vías de inoculación de las mismas y condiciones ambientales. Es necesario tener en cuenta todos estos parámetros que impactan sobre el desempeño de los microorganismos, no solo en la biorremediación, sino también como bioinoculantes y biofertilizantes. Todos los resultados obtenidos en el trabajo contribuyen a incrementar la información de las actinobacterias endofíticas como asistentes de la fitorremediación.

Los resultados del trabajo realizado permiten destacar el potencial de actinobacterias endofíticas para mejorar la tolerancia de plantas sometidas al estrés causado por metales pesados. *Micromonospora halotolerans* (31A6TWB21) se destaca como un prometedor agente bioinoculante a ser utilizado en futuros ensayos de fitorremediación de suelos contaminados.

Conclusiones

En el presente trabajo se pudieron analizar los efectos de dos metales pesados en el crecimiento de dos tipos de organismos con potencial biorremediador: *Festuca arundinacea*,

y actinobacterias PGP endófitas de los géneros *Micromonospora* y *Streptomyces*. Se pudo determinar que existe una diferencia en la toxicidad del cobre y el zinc sobre la planta y actinobacterias estudiadas, determinando que el cobre resulta más tóxico que el zinc. Se lograron obtener al menos dos cepas metalotolerantes, y se pudo comprobar que la inoculación de al menos una de las dos cepas (31A6TWB2.1) en las condiciones estudiadas, muestra ventajas significativas en el alivio al estrés por la presencia de Cu^{2+} , y que la otra cepa estudiada causa una tendencia a mejorar los parámetros de desarrollo de la planta en estas condiciones. En conjunto, los resultados de este trabajo contribuyen a incrementar el conocimiento de la aplicación de las actinobacterias PGP endófitas como organismos asistentes de la fitorremediación, proporcionando una base para futuras investigaciones y aplicaciones en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados

Bibliografía

- Adriano, D. C. (2001). *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals* (Vol. 860). New York: Springer.
- Afrin, L. B. (2010). Fatal copper deficiency from excessive use of zinc-based denture adhesive. *The American Journal of the Medical Sciences*, 340(2), 164-8.
- Ahrland, S., Chatt, J., & Davies, N. R. (1958). *Q. Rev. Chem. Soc.* 12, 265.
- Alonso-Bravo, J. N., Montañó-Arias, N. M., Santoyo-Pizano, G., Márquez-Benavides, L., Saucedo-Martínez, B. C., & Sánchez-Yáñez, J. M. (2018). Biorecuperación y fitorremediación de suelo impactado por aceite residual automotriz. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 9(1), 45-51.
- Amezcuá-Romero, J. C., & Lara-Flores, M. (2017). El zinc en las plantas. *Ciencia*, 68(3), 28-35.
- Araujo, W. L., Marcon, J., Maccheroni, W. Jr, Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W. L., & Azevedo J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4906–4914
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Erratum for taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4), iii.
- Bilos, C., Tatone, L. M., Skorupka, C. N., Astoviza, M. J., Romero, C. L., & Colombo, J. C. (2019). Heavy metal contents in the most productive Argentinean Humid Pampa soils. *International Journal of Environment and Health*, 9(3), 271-287.
- Bjerrum, N. (1936). *Bjerrum's Inorganic Chemistry*, 3rd Danish ed.
- Bussler, W. In J. F., Loneragan, A. D., Robson, & R. D. Graham, eds. (1981). In J. F. Loneragan, A. D. Robson, & R. D. Graham, eds. *Copper in Soils and Plants*. Academic Press, New York.

- Cao, A., Cappai, G., Carucci, A., & Muntoni, A. (2004). Selection of plants for zinc and lead phytoremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 39(4), 1011-1024.
- Carrillo, J. (2003). *Manejo de Pasturas*. EEA INTA Balcarce. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. p 458.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino G. & Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell death discovery*, 3(1), 1-12.
- Chen, X., Sun, C., Zhang, Q., Jiang, X., Liu, C., Lin, H., & Li, B. (2023). Selected rhizobacteria facilitated phytoremediation of barren and heavy metal contaminated gold mine tailings by *Festuca arundinacea*. *Chemosphere*, 337, 139297.
- Chen, Y., Hu, W., Huang, B., Weindorf, D. C., Rajan, N., Liu, X., & Niedermann, S. (2013). Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 98, 324-330.
- Cittadino, A., Ocello, N., Majul, M. V., Ajhuacho, R., Dietrich, P., & Igarzabal, M. A. (2020). Heavy metal pollution and health risk assessment of soils from open dumps in the Metropolitan Area of Buenos Aires, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1-9.
- Corvalán Moya, C., Bruni, C., Barbini, A., & Previtali, E. (2024). An analysis of heavy metals movements on soils from places with high level risk of flooding and different anthropogenic activities. *Journal of Materials and Environmental Science*, 15 (1), 162, 178.
- Covarrubias, S. A., & Cabriaes, J. J. P. (2017). Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 7-21.
- Crespo, C., Barbieri, P., Cuervo, M., & Rodriguez, M. P. (2021). Fertilización con zinc, cobre y cloro en el cultivo de trigo en el sudeste bonaerense. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 120(2), 076-076.
- Cui, W., Li, X., Duan, W., Xie, M., & Dong, X. (2023). Heavy metal stabilization remediation in polluted soils with stabilizing materials: a review. *Environmental Geochemistry and Health*, 45(7), 4127-4163.
- Cullen, T. (1997). *Festuca Alta*. Revolución varietal. *Revista Agromercado*, 11-12.
- de-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., & Bashan, Y. (2012). The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61, 171-189.
- Della Mónica, I. F., Novas, M. V., Iannone, L. J., Querejeta, G., Scervino, J. M., Pitta-Alvarez, S. I., & Regalado, J. J. (2018). Infection with *Micromonospora* strain SB3 promotes *in vitro* growth of *Lolium multiflorum* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134, 445-455.
- Della Mónica, I. F., Olivero, L., Scervino, J. M., & Novas, M. V. (2017). Novel endophytic actinobacterial strains isolated from *Bromus auleticus* with activity against phytopathogenic fungi. *Dissertation, XXXVI Jornadas Argentinas de Botánica*, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. p. 118. <http://botanicaargentina.com.ar/wpcontent/uploads/2017/09/SAB-2018.pdf>
- de Souza Freitas, E. V., & do Nascimento, C. W. A. (2009). The use of NTA for lead phytoextraction from soil from a battery recycling site. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 833-837.

- Duffus, J. H. (2002). "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 793-807.
- Falbe, J., & Regitz, M. (Eds.). (1996). *Roempp Chemie Lexikon*. Georg Thieme.
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- García de Salamone, I. E. (2021). Taller de Biorremediación: vinculando sectores para una solución integral (1a ed.). Asociación Argentina de Microbiología.
- Garbisu, C., Amézaga, I., & Alkorta, I. (2002). Biorremediación y ecología. *Ecosistemas*, 11(3).
- García, L. S., Milesi Delaye, L. A., Darder, M. L., Caprile, A. C., & Andriulo, A. E. (2019). Contenido de elementos traza en argiudoles de la cuenca del arroyo Pergamino bajo agricultura continua. *Ciencia del suelo*, 37(2), 257-268.
- Grant, R., & Grant, C. (Eds.). (1987). *Grant and Hackh's Chemical Dictionary*. McGraw-Hill.
- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant bacterium signalling process. *Soil Biology and Biochemistry*, 37:395-412
- Grcman, H., Velikonja-Bolta, Š., Vodnik, D., Kos, B., & Leštan, D. (2001). EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: Metal accumulation, leaching, and toxicity. *Plant and Soil*, 235(1), 105-114.
- Gupta, U. C. (1979). In I. O. Nriagu, ed. *Copper in the Environment*. Wiley, New York.
- Hallman J., Quadt-Hallman A., Mahafee W. F., & Kloepper J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 895-914
- Harris, E. D. (2000). Cellular copper transport and metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 20:291-310.
- Hidalgo, N., Fernández, P., Bustos, D., Rosa, M., & Senese, A. (2021). Cepas nativas tolerantes a metales pesados aislados del pasivo minero de la mina Hualilán, Argentina. *Revista Colombiana de Materiales*, (18), 21-32.
- Hiltner, L. (1904). Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft*, 98, 59-78
- Hodgson, E., Mailman, R. B., & Chambers, J. E. (Eds.). (1988). *Macmillan Dictionary of Toxicology*. Macmillan.
- Hooda, P. S. (2010). *Trace elements in soils* (Vol. 618). Chichester: Wiley.
- Hordyjewska, A., Popiolek, Ł., & Kocot J. (2014). The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27(4), 611-21.
- Ivanova, E. M., Kholodova, V. P., & Kuznetsov, V. V. (2010). Biological effects of high copper and zinc concentrations and their interaction in rapeseed plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 806-814.
- Jaemsaeng, R., Jantasuriyarat, C., & Thamchaipenet, A. (2018). Molecular interaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD)-producing endophytic *Streptomyces* sp. GMKU 336 towards salt-stress resistance of *Oryza sativa* L. cv. KDML105. *Scientific Reports*, 8, 1950
- Jodeh, S., Odeh, R., Sawalhi, M., Abu Obeid, A., Salghi, R., Hammouti, B., Radi, S., & Warad, I. (2015). Adsorption of lead and zinc from used lubricant oil using agricultural soil: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Materials and Environmental Science*, 6(2), 580-591

- Kabata-Pendias, A., & Mukherjee, A. B. (2007). Trace Elements from Soil to Human; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany.
- Kandpal, K. C., Jain, D. A., Kumar, U., Tripathi, R., & Kumar, T. S. (2012). Isolation and screening of endophytic actinomycetes producing antibacterial compound from *Citrus aurantifolia* Fruit. *European Journal of Experimental Biology*, 2,1733–1737
- Khalil, M. M. H., Abou-Shanab, R. A. I, Salem, A. E-N. M., Omer, A. M., & Aboelazm, T. A. (2016). Biosorption of trivalent chromium using Ca-alginate immobilized and alkali-treated biomass. *Journal of Computational Science and Technology*, 5,1–6
- Khashij, S., Karimi, B., & Makhdoumi, P. (2018). Phytoremediation with *Festuca arundinacea*: A mini review. *International Journal of Health and Life Sciences*, 4(2).
- Kirova, G., Velkova, Z., & Gochev, V. (2012). Copper (II) removal by heat inactivated *Streptomyces fradiae* biomass: Surface chemistry characterization of the biosorbent. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 77-82.
- Kos, B., & Leštan, D. (2003). Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers. *Environmental Science & Technology*, 37(3), 624-629.
- Kumar, A., Droby, S., Singh, V. K., Singh, S. K., & White, J. F. (2020). Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial endophytes* (pp. 1-33). Woodhead Publishing.
- Kumar, V., Kumar, M., Shrivastava, N., Bisht, S., Sharma, S., & Varma, A. (2016). Interaction among rhizospheric microbes, soil, and plant roots: Influence on micronutrient uptake and bioavailability. *Plant, Soil and Microbes: Volume 2: Mechanisms and Molecular Interactions*, 169-185.
- Le Vo, P., Tran, D. A., Pham, T. L., Thu, H. L. T., & Viet, N. N. (2022). Advances in Research on Water Resources and Environmental Systems.
- Lidon, F. C., & Henriques F. S. (1993). *Journal of Plant Nutrition*, 16,1449-1464.
- Li, H., Lin, Y., Guan, W., Chang, J., Xu, L., Guo, J., & Wei, G. (2010). Biosorption of Zn (II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1-3), 151-159.
- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69,1875–1883
- Lin, Y., Wang, X., Wang, B., Mohamad, O., & Wei, G. (2012). Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinciresistens*, a novel actinomycete. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 77, 7-17.
- Locci, R., & Schaal, K. P. (1980). Apical growth in facultative anaerobic actinomycetes as determined by immunofluorescent labeling. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 246(1), 112-118.
- Lozet, J., & Mathieu, C. (1991). *Dictionary of Soil Science* (2nd ed.). A. A. Balkema.
- Lundberg, D. S., Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., Kunin, V., Del Rio, T. G., Edgar, R. C., Eickhorst, T., Ley, R. E., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Dangl, J. L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature*, 488(7409), 86-90.
- Lura, c.L., C.A. Gonzales, , & Trippi V.S. . (1994). *Plant Cell Physiology*, 35,11-15.
- Tapiero, H. , Townsend, D. M., & Tew K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(9),386-98.
- Maldonado, J. M. (2009). Ciudades y contaminación ambiental. *Revista de ingeniería*, (30), 66-71.

- Malekzadeh, F., Latifi, A.M., Shahamat, M., Levin, M., & Colwell R.R. (2002). Effects of selected physical and chemical parameters on uranium uptake by the bacterium *Chryseomonas* MGF-48. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18,599–602
- Malfanova, N., Lugtenberg, B. J., & Berg, G. (2013). Bacterial endophytes: who and where, and what are they doing there?. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, 1, 391-403.
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H., & Pauss, A. (1999). Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water Research*, 33(6), 1347-1354.
- Manzanares, V. M. (2014). Externalidades y medioambiente. *Revista Iberoamericana de Organización de Empresas y Marketing*, 2, 15.
- Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Martí, L., Filippini, M. F., Drovandi, A., Salcedo, C., Troilo, S., & Valdés, A. (2011). Evaluación de metales pesados en suelos de los oasis irrigados de la Provincia de Mendoza: I. Concentraciones totales de Zn, Pb, Cd y Cu. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 43(2), 203-221.
- Mayfield, C. I., Williams, S. T., Ruddick, S. M., & Hatfield H. L. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 4,79–91.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of Environmental Management*,174, 14-25.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M. J., Samson, D., & Tack, F. M. G. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 58(8), 1011-1022.
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.
- Mir, A. R., Pichtel, J., & Hayat, S. (2021). Copper: uptake, toxicity and tolerance in plants and management of Cu-contaminated soil. *Biometals*, 34(4), 737-759.
- Morris, C. (Ed.). (1992). *Academic Press Dictionary of Science and Technology*. Academic Press.
- Mosbah, R., & Sahmoune, M. (2013). Biosorption of heavy metals by *Streptomyces* species—an overview. *Open Chemistry*, 11(9), 1412-1422.
- Naderi, M. R., Danesh-Shahraki, A., & Raiesi, F. (2014). Evaluation the efficiency of six sunflower cultivars in phytoextraction of lead from a Pb-bearing soil for long term. *Water and Soil*, 28(3), 596-604.
- Nyiramigisha, P., Komariah & Sajidan (2021) Harmful Impacts of Heavy Metal Contamination in the Soil and Crops Grown Around Dumpsites *Reviews in Agricultural Science*, 9, 271–282
- Ogeleka, D. F.; & Nwudu, A. (2019). An appraisal of copper and zinc as Contaminants of Potential Ecological Concern (COPEC) on onions (*Allium cepa* L.). *Nigerian Journal of Chemical Research*, 24(1), 68-77.
- Organización de las Naciones Unidas (2024a). Objetivos de desarrollo sostenible. Recuperado el 17 de julio de 2024 de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

Organización de las Naciones Unidas (2024b). Objetivo 14: Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos. Recuperado el 17 de julio de 2024 de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/oceans/>

Organización de las Naciones Unidas (2024c). Objetivo 15: Gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la degradación de las tierras, detener la pérdida de biodiversidad. Recuperado el 17 de julio de 2024 de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/biodiversidad/>

Ortúzar, M., Trujillo, M. E., Román-Ponce, B., & Carro, L. (2020). *Micromonospora* metallophores: A plant growth promotion trait useful for bacterial-assisted phytoremediation?. *Science of the Total Environment*, 739, 139850.

Parker, S. P. (Ed.). (1989). *McGraw-Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms* (4th ed.). McGraw-Hill.

Petrini, O. (1991). Fungal Endophytes of Tree leaves. In J. H. Andrews & S. S. Hirano (Eds.), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer, Nueva York.

Quartacci, M. F., Irtelli, B., Baker, A. J. M., & Navari-Izzo, F., (2007). The use of NTA and EDDS for enhanced phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by *Brassica carinata*. *Chemosphere*, 68, 1920–1928.

Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh, M. R., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2020). Zinc Poisoning - Symptoms, Causes, Treatments. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(15), 1489-1498.

Rascio, N. & Navari-Izzo, F. (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180, 169–181

Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Lagos, M. D., & Jimenez, E. E. G. (2016). Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Ingeniería Investigación y Desarrollo: 12+ D*, 16(2), 66-77.

Römhelt, V., & Marschner, H. (1991). Function of micronutrients in plants. *Micronutrients in Agriculture*, 4, 297-328.

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 827–837

Rosso, B. S. (2016). Evaluación de germoplasma promisorio: *Festuca arundinacea* var *letourneuxiana*. Producción y Utilización de Pasturas, 39º Congreso Argentino de Producción Animal, *Revista Argentina de Producción Animal*, 36(Suppl. 1), 325.

Sahmoune, M. N., Louhab, K., Boukhar, A., Addad, J., & Barr, S. (2009). Kinetic and equilibrium models for the biosorption of Cr (III) on *Streptomyces rimosus*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91(7), 1291-1303.

Sahmoune, N., Louhab, K., Addad, J., & Goma, B. (2006). Effect of chemical treatment of the biomass fungic on the capacity of adsorption of the chromium. *European Journal of Scientific Research*, 13(3), 462-470.

Saifullah, R., Meers, E., Qadir, M. P., de Caritat, F., Tack, F. M. G., Laing, D. G., & Zia, M. H. (2009). EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere*, 74(10), 1279-1291.

Scott, J. S., & Smith, P. G. (1981). *Dictionary of Waste and Water Treatment*. Butterworths.

Shan, Q., Liu, X., Zhang, J., Chen, G., Liu, S., Zhang, P., & Wang, Y. (2011). Analysis on the tolerance of four ecotype plants against copper stress in soil. *Procedia Environmental Sciences*, 10, 1802-1810.

Shimizu, M. (2011). Endophytic actinomycetes: biocontrol agents and growth promoters. *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses*, 201-220.

- Shirling, E. T., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 16(3), 313-340.
- Sim, C. S. F., Chen, S. H., & Ting, A. S. Y. (2019). Endophytes: Emerging tools for the bioremediation of pollutants. *Emerging and eco-friendly approaches for waste management*, 189-217.
- Sims, J.T. & G.V. Johnson. (1991). Micronutrient soil tests. In: *Micronutrients in agriculture*. Book series N°4. Mortvedt, J.J., Cox F.R., Shuman L.M. & M.R. Welch (Eds.) Ed. SSSA Madison, Winsconsin, USA.pp. 427-476.
- Singh, A., Sharma, R. K., Agrawal, M., & Marshall, F. M. (2010). Risk assessment of heavy metal toxicity through contaminated vegetables from wastewater irrigated area of Varanasi, India. *Tropical ecology*, 51(2), 375-387.
- Streit, B. (1994). *Lexikon der Ökotoxikologie*. VCH.
- Tervet, I. W., & Hollis, J. P. (1948) Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology*, 38,960–967
- Timková, I., Sedláková-Kaduková, J., & Pristaš, P. (2018). Biosorption and bioaccumulation abilities of actinomycetes/streptomycetes isolated from metal contaminated sites. *Separations*, 5(4), 54.
- Tiwari, G., Duraivadivel, P., Sharma, S., & Hariprasad, P. (2018). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing beneficial rhizobacteria ameliorate the biomass characters of *Panicum maximum* Jacq. by mitigating drought and salt stress. *Scientific Reports*, 8, 17513
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung, C. M., Crawford, D. L., Salove, M. H., Deobald, L. A., Bailey, J. F., & Morra, M. J. (2002). Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*, 68,2161–2171
- Van-Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A. R., Jones, R. J., Montanarella, L., Olazabal, C., & Selvaradjou, S. K. (2004). Reports of the technical working groups. In *Established Under the Thematic Strategy for Soil Protection*. EUR 21319 EN/6 872. Office for Official Publ. Of the European Communities.
- van Dissel, D., Claessen, D., & van Wezel, G. P. (2014). Morphogenesis of *Streptomyces* in submerged cultures. *Advances in applied microbiology*, 89, 1-45.
- Vega, D. J., di Santo, H. E., Grassi, E., Castillo, E. A., Ferreira, A., & Ferreira, V. (2016). *Festuca arundinacea* Schreb.: Caracterización de poblaciones naturalizadas. Producción y Utilización de Pasturas, 39º Congreso Argentino de Producción Animal, *Revista Argentina de Producción Animal*, 36(Suppl. 1), 295-411.
- Ventura, M., Canchaya, C., Fitzgerald, G. F., Gupta, R. S., & van Sinderen, D. (2007). Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91,351–372.
- Wilde, E. W., & Benemann, J. R. (1993). *Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae*. *Biotechnology Advances*, 11,781–812
- Williams, R. J. P., & Frausto da Silva, J. J. R. (1999). *Bringing Chemistry to Life*, Oxford University Press, Oxford.
- Williams, S. T., & Vickers, J. C. (1988). Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biology of actinomycetes*, 88, 265-270.
- Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., & Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98,3889–3894

Yan, X., Liu, M., Zhong, J., Guo, J., & Wu, W. (2018). How human activities affect heavy metal contamination of soil and sediment in a long-term reclaimed area of the Liaohe River Delta, North China. *Sustainability*, 10, 338.

Zaier, H., Ghnaya, T., Rejeb, K. B., Lakhdar, A., Rejeb, S., & Jemal, F. (2010). Effects of EDTA on phytoextraction of heavy metals (Zn, Mn, and Pb) from sludge-amended soil with *Brassica napus*. *Bioresource Technology*, 101(11), 3978-3983

Zanoniani, R., Boggiano, P., & Saldanha, S. (2001). Implantación de *Bromus auleticus* Trinius en cobertura. *Los recursos fitogenéticos del género Bromus en el Cono Sur. Montevideo: PROCISUR*, 35-8.

Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Li, J., Xie, Q., Xu, L. H., & Li, W. J. (2011). *Pseudonocardia serianimatus* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the surface-sterilized leaves of *Artemisia annua* L. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100, 521-528.

Zhao, S., Jia, L., & Duo, L. (2013). The use of a biodegradable chelator for enhanced phytoextraction of heavy metals by *Festuca arundinacea* from municipal solid waste compost and associated heavy metal leaching. *Bioresource Technology*, 129, 249-255.

Zhao, S., Lian, F., & Duo, L. (2011). EDTA-assisted phytoextraction of heavy metals by turfgrass from municipal solid waste compost using permeable barriers and associated potential leaching risk. *Bioresource Technology*, 102(2), 621-626.

Zhu, D., Schwab, A.P. and Banks, M.K. (1999). Heavy Metal Leaching from Mine Tailings as Affected by Plants. *Journal of Environmental Quality*, 28, 1727-1732.

Zúñiga, F. B. (1999). *Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados* (Vol. 1). Uady.

Anexo: Medios de cultivo

Composición del medio de cultivo ISP2 (Shirling y Gottlieb,1966):

Extracto de levadura -----	4 g/l
Malta -----	10 g/l
Dextrosa -----	4 g/l
Agar (se incluye solo para ISP2 agarizado, no para ISP2 líquido)-----	20 g/l
• El medio se ajusta a pH 7.3 antes de agregar el agar. • El medio se esteriliza en autoclave (121°C, 1 atm, 15 minutos)	

Composición del medio de cultivo TWYE (Zhao et al.,2011):

Extracto de levadura -----	0,25 g/l
K ₂ HPO ₄ -----	0,5 g/l
Agar -----	18 g/l
Agua del grifo (Tap water)-----	1l
• El medio se esteriliza en autoclave (121°C, 1 atm, 15 minutos)	

Apéndice: Estadística

Tablas A1. Análisis de la germinación de *Festuca arundinacea* con distintas concentraciones de zinc

Carga de librerías para rmarkdown

```
setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA  
UBACYT2022/Estadistica/Festuca")
```

```
pacman::p_load(#rio,  
  lubridate,  
  #nasapower,  
  janitor,  
  tidyverse,  
  skimr,  
  #see,  
  #GGally,  
  #correlation,  
  ggcorrplot,  
  viridis,  
  performance,  
  ggeffects,  
  emmeans,  
  multcomp,  
  glmmTMB,  
  MASS,  
  lme4,  
  multcompView,  
  DHARMa, #para GLMM-inflados en ceros  
  texreg,  
  DescTools,  
  agricolae,  
  TH.data,  
  mvtnorm,  
  survival,  
  lsmeans,  
  dplyr,  
  cars  
)
```

```
## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-  
library/4.3'  
## (as 'lib' is unspecified)
```

Germinación con zinc

```
library(rlang)
```

```
##  
## Attaching package: 'rlang'  
  
## The following objects are masked from 'package:purrr':  
##
```

```
##      %@@, flatten, flatten_chr, flatten_dbl, flatten_int, flatten_lgl,
##      flatten_raw, invoke, splice

library(readxl)
Germinacion_para_R <- read_excel("GerminacionFestucaconzn.xlsx")
data= data.frame(Germinacion_para_R)
data$propexitos <- (data$germinacion / data$Totalsemillas)#Proporción de
semillas que germinaron
data$concentracion = as.factor(data$concentracion)#Concentración como
factor
str(data)

## 'data.frame':    15 obs. of  4 variables:
## $ concentracion: Factor w/ 5 levels "0","200","500",...: 1 1 1 2 2 2 3
## 3 3 4 ...
## $ germinacion   : num  23 21 20 21 23 23 23 22 20 22 ...
## $ Totalsemillas: num  25 25 25 25 25 25 24 25 26 25 ...
## $ propexitos    : num  0.92 0.84 0.8 0.84 0.92 ...
```

Modelo y Anova

```
M1 <- glm(propexitos ~ concentracion, family = binomial, weights =
Totalsemillas, data = data)
#Modelo propuesto, modelo lineal generalizado familia binomial
summary(M1)

##
## Call:
## glm(formula = propexitos ~ concentracion, family = binomial,
##      data = data, weights = Totalsemillas)
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)    1.7610     0.3264   5.395 6.84e-08 ***
## concentracion200  0.3643     0.4964   0.734  0.463
## concentracion500  0.1108     0.4711   0.235  0.814
## concentracion1000 -0.1028     0.4536  -0.227  0.821
## concentracion2000 -2.1112     0.4019  -5.253 1.50e-07 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 69.5709  on 14  degrees of freedom
## Residual deviance:  8.1729  on 10  degrees of freedom
## AIC: 63.597
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4

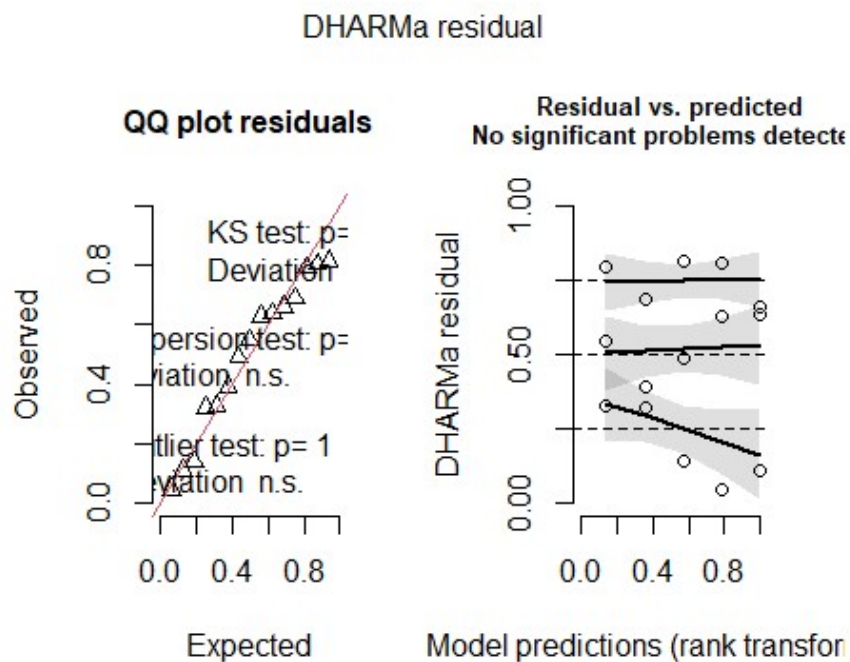
anova_M1 <- anova(M1, test = "Chisq")#ANOVA para el modelo
print(anova_M1)

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: binomial, link: logit
```

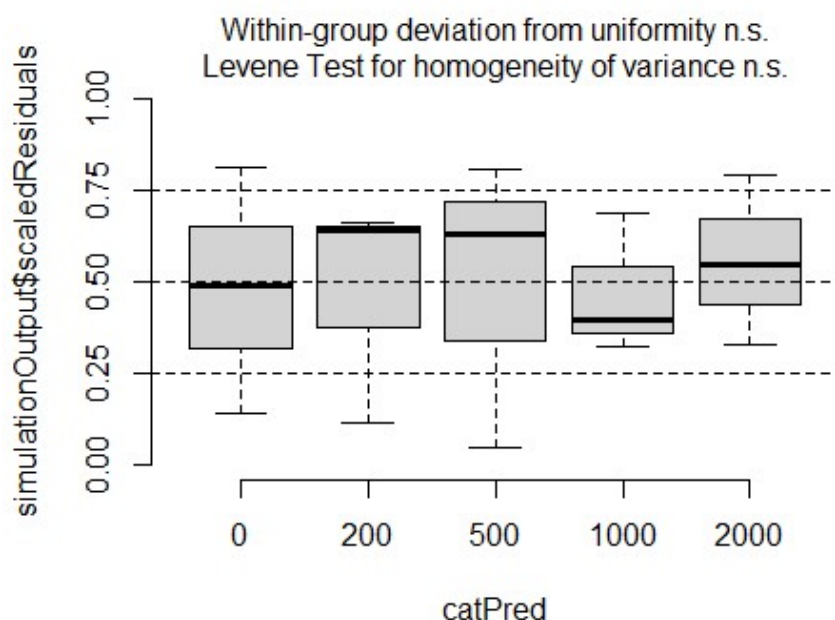
```
##
## Response: propexitos
##
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##           Df Deviance Resid. Df Resid. Dev  Pr(>Chi)
## NULL                14      69.571
## concentracion  4    61.398      10      8.173 1.474e-12 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Supuestos del modelo

```
library(DHARMa)
sim <- simulateResiduals(fittedMod = M1, plot = T) #Chequeo de los
supuestos del modelo con DHARMa
```



```
plotResiduals(sim, data$concentracion)
```



Tukey

```
library(emmeans)
compVR <- emmeans(M1, pairwise ~ concentracion, type = "response") #Tukey
summary(compVR)
```

```
## $emmeans
## concentracion prob SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0 0.853 0.0409 Inf 0.754 0.917
## 200 0.893 0.0356 Inf 0.801 0.946
## 500 0.867 0.0393 Inf 0.770 0.927
## 1000 0.840 0.0423 Inf 0.739 0.907
## 2000 0.413 0.0569 Inf 0.308 0.527
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale
##
## $contrasts
## contrast odds.ratio SE df null
z.ratio
## concentracion0 / concentracion200 0.695 0.345 Inf 1 -
0.734
## concentracion0 / concentracion500 0.895 0.422 Inf 1 -
0.235
## concentracion0 / concentracion1000 1.108 0.503 Inf 1
0.227
## concentracion0 / concentracion2000 8.258 3.319 Inf 1
5.253
## concentracion200 / concentracion500 1.288 0.651 Inf 1
0.502
## concentracion200 / concentracion1000 1.595 0.780 Inf 1
```

```

0.955
## concentracion200 / concentracion2000      11.887  5.248 Inf      1
5.607
## concentracion500 / concentracion1000       1.238  0.574 Inf      1
0.461
## concentracion500 / concentracion2000       9.226  3.808 Inf      1
5.383
## concentracion1000 / concentracion2000      7.452  2.926 Inf      1
5.115
## p.value
## 0.9487
## 0.9993
## 0.9994
## <.0001
## 0.9872
## 0.8751
## <.0001
## 0.9907
## <.0001
## <.0001
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log odds ratio scale

```

Probabilidades y errores

```

probabilidades <- emmeans(M1, ~ concentracion, type = "response")
summary(probabilidades)

## concentracion prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0              0.853 0.0409 Inf      0.754      0.917
## 200             0.893 0.0356 Inf      0.801      0.946
## 500             0.867 0.0393 Inf      0.770      0.927
## 1000            0.840 0.0423 Inf      0.739      0.907
## 2000            0.413 0.0569 Inf      0.308      0.527
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale

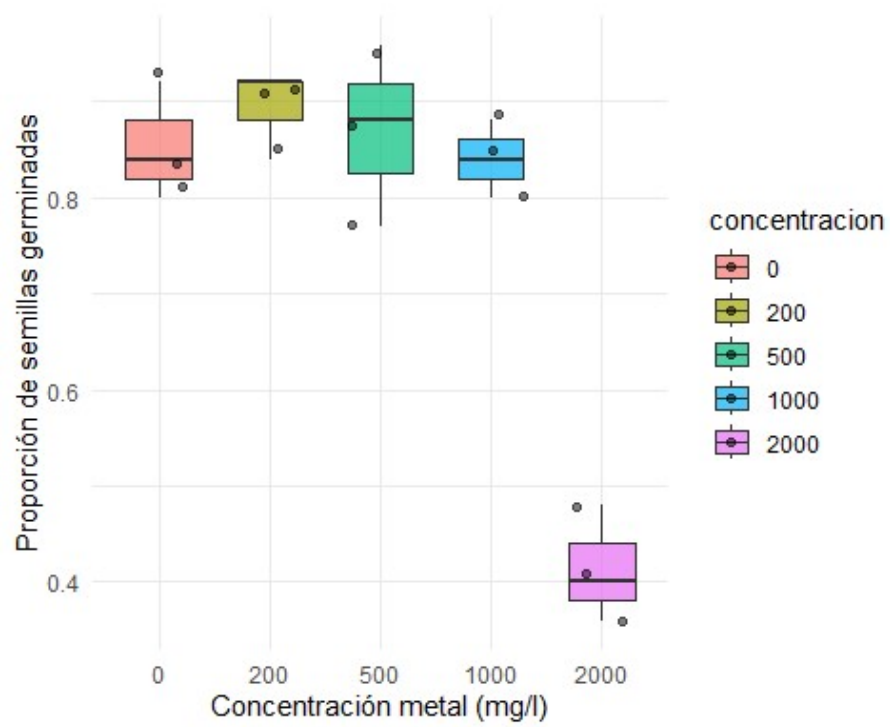
```

Gráfico

```

library(ggplot2)
ggplot(data, aes(x = concentracion, y = propexitos, fill =
concentracion)) +
geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5)+
xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Proporción de semillas
germinadas") + theme_minimal()

```



Tablas A2. Longitudes de vástago y raíz en ensayo de germinación de *Festuca arundinacea* con distintas concentraciones de zinc

Carga de librerías para rmarkdown

```
setwd("C:/Users/ailel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA  
UBACYT2022/Estadistica/Festuca")
```

```
pacman::p_load(#rio,  
lubridate,  
#nasapower,  
janitor,  
tidyverse,  
skimr,  
#see,  
#GGally,  
#correlation,  
ggcorrplot,  
viridis,  
performance,  
ggeffects,  
emmeans,  
multcomp,  
glmmTMB,  
MASS,  
lme4,  
multcompView,  
DHARMA,#para GLMM-inflados en ceros  
texreg,  
DescTools,  
agricolae,  
TH.data,  
mvtnorm,  
survival,  
lsmeans,  
dplyr,  
cars  
)
```

```
## Installing package into 'C:/Users/ailel/AppData/Local/R/win-  
library/4.3'
```

```
## (as 'lib' is unspecified)
```

Análisis del vástago en ensayo de germinación con zinc

```
library(readxl)  
AnovaFestucaVastagozn <-  
read_excel("LongitudVastagopromediadoFestucaconzn.xlsx")  
datavastago = data.frame(AnovaFestucaVastagozn)  
datavastago$concl=as.factor(datavastago$concl) #Concentración de metal  
como factor  
datavastago$caja1=as.factor(datavastago$caja1) #Número de caja como  
factor  
str(datavastago)
```

```
## 'data.frame': 15 obs. of 3 variables:
## $ caja1 : Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 ...
## $ conc1 : Factor w/ 5 levels "0","200","500",...: 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4
## $ Media1: num 2.617 0.862 1.365 0.314 1.1 ...
```

Modelo y Anova

```
library(nlme)

##
## Attaching package: 'nlme'

## The following object is masked from 'package:lme4':
##
## lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## collapse

anova_mv<-gls(Media1 ~ conc1, data = datavastago) #Ajuste de modelo
lineal usando cuadrados mínimos generalizados
anova(anova_mv)

## Denom. DF: 10
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)    1 52.85001  <.0001
## conc1          4  3.18509  0.0625
```

Prueba de supuestos

```
resid_mv<-resid(anova_mv)
pred_mv <- predict(anova_mv)
shapiro.test(resid_mv)# Prueba de normalidad

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: resid_mv
## W = 0.95508, p-value = 0.6076

library(car)

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
## Recode

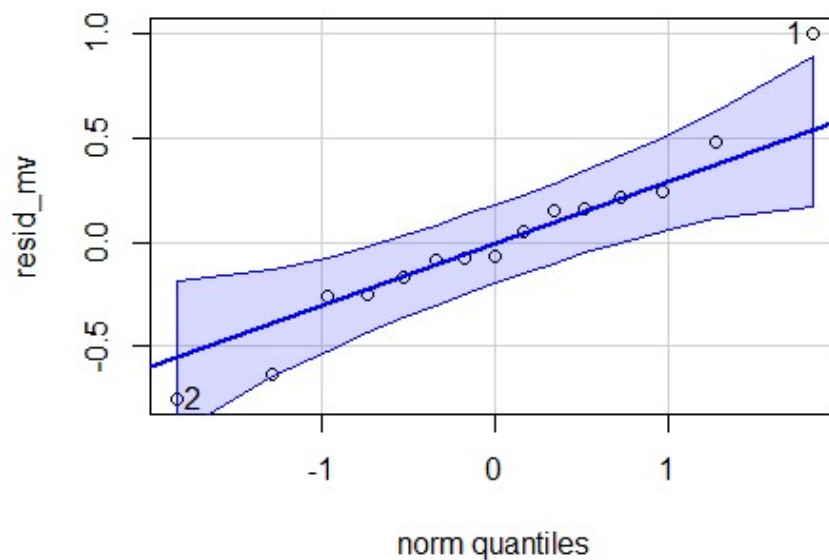
## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## recode
```

```
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

leveneTest(datavastago$Media1 ~ datavastago$concl1)#Prueba de
homocedasticidad

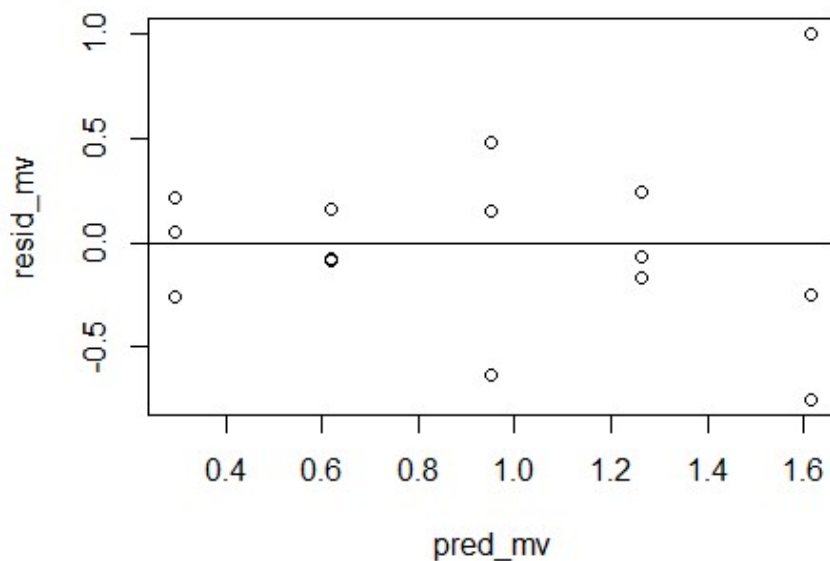
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group  4  1.0544 0.4275
##      10

library(car)
qqPlot(resid_mv)
```



```
## [1] 1 2

plot(pred_mv, resid_mv)
abline(0,0)
```



Modelado de varianza

```
# Modelo con varIdent
varIdent_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varIdent(form = ~ 1 |
conc1), data = datavastago)
pred_varIdent <- fitted(varIdent_model)
residStd_varIdent <- resid(varIdent_model, type = "pearson")

# Modelo con varExp
varExp_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varExp(form = ~ fitted(.)),
data = datavastago)
pred_varExp <- fitted(varExp_model)
residStd_varExp <- resid(varExp_model, type = "pearson")

# Modelo con varPower
varPower_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varPower(form = ~
fitted(.)), data = datavastago)
pred_varPower <- fitted(varPower_model)
residStd_varPower <- resid(varPower_model, type = "pearson")

# Comparación de los modelos usando AIC
AIC(varIdent_model, varExp_model, varPower_model)

##           df      AIC
## varIdent_model 10 31.63454
## varExp_model    7 29.88137
## varPower_model  7 30.46773
```

Anova con varianza modelada

```
anova(varExp_model)#Elegí el modelo con menor valor de AIC
```

```
## Denom. DF: 10
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)      1 45.67478 <.0001
## conc1           4  4.42119 0.0258
```

Tukey

```
library(multcomp)
tukey_result <- glht(varExp_model, linfct = mcp(conc1 =
"Tukey"))#Contrastes entre tratamientos
summary(tukey_result)

##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
##
##
## Fit: gls(model = Media1 ~ conc1, data = datavastago, weights =
varExp(form = ~fitted(.)))
##
## Linear Hypotheses:
##          Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## 200 - 0 == 0      -0.6651    0.5117  -1.300  0.6712
## 500 - 0 == 0      -0.3524    0.5561  -0.634  0.9665
## 1000 - 0 == 0     -0.9973    0.4849  -2.057  0.2209
## 2000 - 0 == 0     -1.3219    0.4707  -2.808  0.0354 *
## 500 - 200 == 0      0.3127    0.3978   0.786  0.9284
## 1000 - 200 == 0    -0.3323    0.2900  -1.146  0.7656
## 2000 - 200 == 0    -0.6568    0.2655  -2.474  0.0873 .
## 1000 - 500 == 0    -0.6450    0.3627  -1.778  0.3635
## 2000 - 500 == 0    -0.9696    0.3434  -2.823  0.0342 *
## 2000 - 1000 == 0   -0.3246    0.2093  -1.551  0.5058
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)

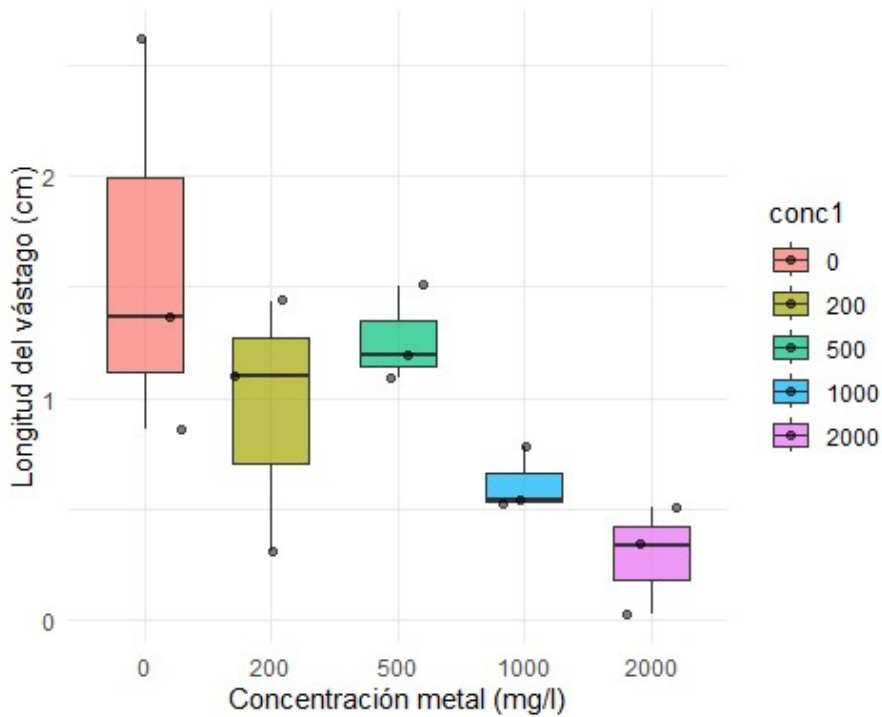
emmeans_res <- emmeans(varExp_model, ~ conc1)#Medias para cada
tratamiento
emmeans_res

## conc1 emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## 0      1.615 0.454  3.48  0.2753  2.954
## 200     0.950 0.235 10.00  0.4252  1.474
## 500     1.262 0.321  7.06  0.5053  2.019
## 1000    0.617 0.169  6.86  0.2151  1.020
## 2000    0.293 0.123  3.57 -0.0653  0.651
##
## Degrees-of-freedom method: satterthwaite
## Confidence level used: 0.95
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
ggplot(datavastago, aes(x = conc1, y = Media1, fill = conc1)) +
```

```
geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5) +
xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Longitud del vástago (cm)") +
theme_minimal()
```



Análisis de la raíz en ensayo de germinación con zinc

```
AnovaFestucaRaizn <-
read_excel("LongitudRaizpromediadaFestucaconzn.xlsx")

## New names:
## • `` -> `...4`
## • `` -> `...5`

dataraiz = data.frame(AnovaFestucaRaizn)
dataraiz$conc1=as.factor(dataraiz$conc1)#Concentración de metal como
factor
dataraiz$caja1=as.factor(dataraiz$caja1)#Número de caja como factor
str(dataraiz)

## 'data.frame': 15 obs. of 5 variables:
## $ caja1 : Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 ...
## $ conc1 : Factor w/ 5 levels "0","200","500",...: 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4
## $ Media1: num 2.339 1.243 1.365 0.683 1.34 ...
## $ ...4 : logi NA NA NA NA NA ...
## $ ...5 : chr NA NA NA NA ...
```

Anova

```
library(nlme)
anova_mvraiz<-gls(Media1 ~ conc1, data = dataraiz)#Ajuste de modelo
```

lineal usando cuadrados mínimos generalizados

```
anova(anova_mvraiz)
```

```
## Denom. DF: 10
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)    1 53.51713 <.0001
## conc1          4 10.83321  0.0012
```

Supuestos del modelo

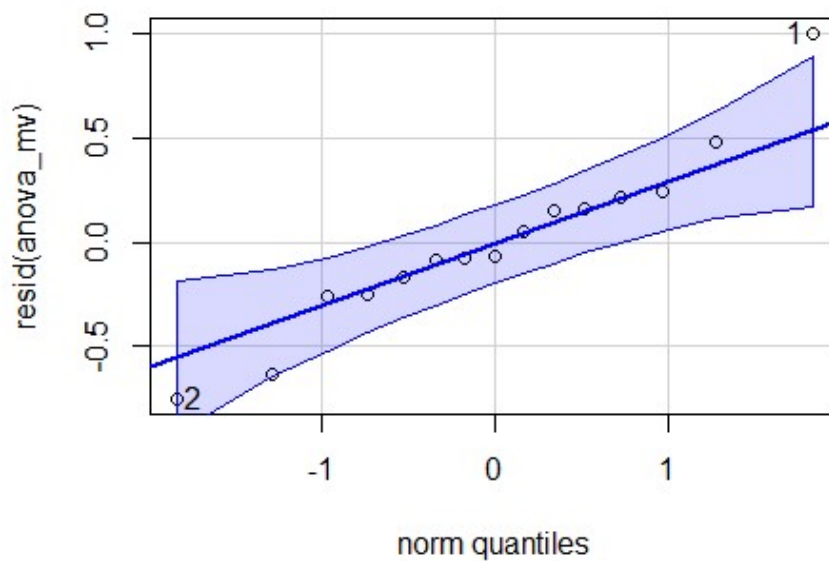
```
resid_mvraiz<-resid(anova_mvraiz)
shapiro.test(resid_mvraiz)# Prueba de normalidad
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  resid_mvraiz
## W = 0.95149, p-value = 0.5482
```

```
library(car)
leveneTest(dataaiz$Media1 ~ dataaiz$conc1)# Prueba de homocedasticidad
```

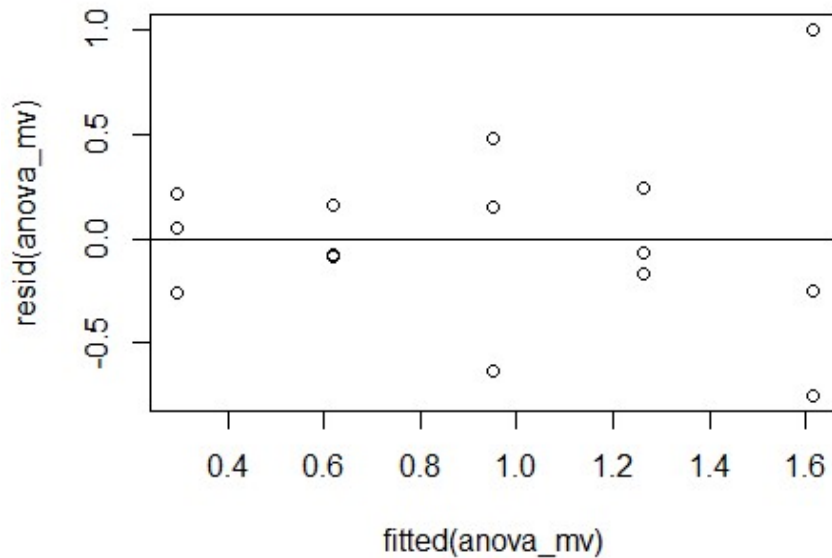
```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 4  0.9594 0.4704
##      10
```

```
qqPlot(resid(anova_mv))
```



```
## [1] 1 2
```

```
plot(fitted(anova_mv), resid(anova_mv))
abline(0, 0)
```



Modelado de varianza

```
# Modelos de varianza
# Modelo con varIdent
varIdent_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varIdent(form = ~ 1 |
conc1), data = dataaiz)
pred_varIdent <- fitted(varIdent_model)
residStd_varIdent <- resid(varIdent_model, type = "pearson")

# Modelo con varExp
varExp_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varExp(form = ~ fitted(.)),
data = dataaiz)
pred_varExp <- fitted(varExp_model)
residStd_varExp <- resid(varExp_model, type = "pearson")

# Modelo con varPower
varPower_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varPower(form = ~
fitted(.)), data = dataaiz)
pred_varPower <- fitted(varPower_model)
residStd_varPower <- resid(varPower_model, type = "pearson")

# Comparación de Los modelos usando AIC
AIC(varIdent_model, varExp_model, varPower_model)

##           df      AIC
## varIdent_model 10 20.32478
## varExp_model    7 16.98911
## varPower_model  7 15.35680
```

Anova con varianza modelada

```
anova(varPower_model)#Elegí el modelo con menor valor de AIC
```

```
## Denom. DF: 10
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)      1 22.22885  0.0008
## conc1           4 10.36456  0.0014
```

Tukey

```
library(multcomp)
tukey_resultraiz <- glht(varPower_model, linfct = mcp(conc1 =
"Tukey"))#Contrastes entre tratamientos
summary(tukey_resultraiz)

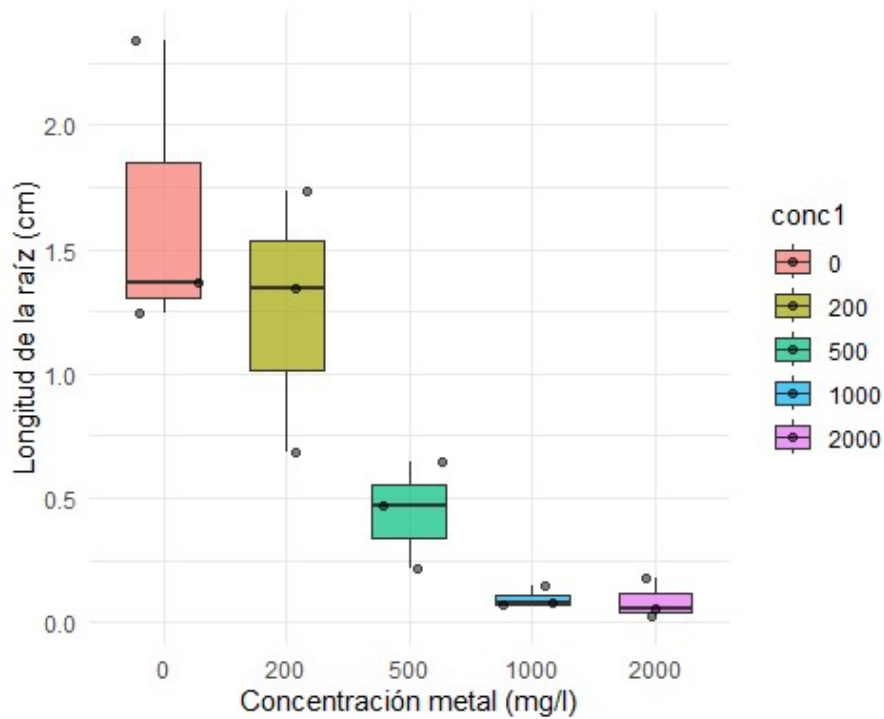
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
##
##
## Fit: gls(model = Media1 ~ conc1, data = dataaraiz, weights =
varPower(form = ~fitted(.)))
##
## Linear Hypotheses:
##          Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## 200 - 0 == 0      -0.39629    0.45799  -0.865 0.888699
## 500 - 0 == 0      -1.20605    0.37875  -3.184 0.009315 **
## 1000 - 0 == 0     -1.55210    0.35836  -4.331 0.000116 ***
## 2000 - 0 == 0     -1.56400    0.35796  -4.369 < 1e-04 ***
## 500 - 200 == 0    -0.80976    0.31549  -2.567 0.058887 .
## 1000 - 200 == 0   -1.15581    0.29069  -3.976 0.000499 ***
## 2000 - 200 == 0   -1.16771    0.29019  -4.024 0.000413 ***
## 1000 - 500 == 0   -0.34605    0.13490  -2.565 0.059106 .
## 2000 - 500 == 0   -0.35794    0.13381  -2.675 0.043856 *
## 2000 - 1000 == 0  -0.01190    0.05364  -0.222 0.999303
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)

emmeans_res <- emmeans(varPower_model, ~ conc1)#Medias para cada
tratamiento
emmeans_res

## conc1 emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## 0      1.6490 0.3561 4.23  0.68113    2.617
## 200    1.2527 0.2880 5.25  0.52312    1.982
## 500    0.4429 0.1289 9.84  0.15511    0.731
## 1000   0.0969 0.0398 4.65 -0.00774    0.202
## 2000   0.0850 0.0360 4.20 -0.01301    0.183
##
## Degrees-of-freedom method: satterthwaite
## Confidence level used: 0.95
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
ggplot(data, aes(x = conc1, y = Media1, fill = conc1)) +
  geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
  geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5) +
  xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Longitud de la raíz (cm)") +
  theme_minimal()
```



Tablas A3. Análisis de la germinación de *Festuca arundinacea* con distintas concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
setwd("C:/Users/ailel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA  
UBACYT2022/Estadistica/Festuca")
```

```
pacman::p_load(#rio,  
  lubridate,  
  #nasapower,  
  janitor,  
  tidyverse,  
  skimr,  
  #see,  
  #GGally,  
  #correlation,  
  ggcorrplot,  
  viridis,  
  performance,  
  ggeffects,  
  emmeans,  
  multcomp,  
  glmmTMB,  
  MASS,  
  lme4,  
  multcompView,  
  DHARMA,#para GLMM-inflados en ceros  
  texreg,  
  DescTools,  
  agricolae,  
  TH.data,  
  mvtnorm,  
  survival,  
  lsmeans,  
  dplyr,  
  cars  
)
```

```
## Installing package into 'C:/Users/ailel/AppData/Local/R/win-  
library/4.3'  
## (as 'lib' is unspecified)
```

Germinación con cobre

```
library(rlang)  
  
##  
## Attaching package: 'rlang'  
  
## The following objects are masked from 'package:purrr':  
##  
##    %@%, flatten, flatten_chr, flatten_dbl, flatten_int, flatten_lgl,  
##    flatten_raw, invoke, splice
```

```

library(readxl)
Germinacion_para_R <- read_excel("GerminacionFestucaconcu.xlsx")
data= data.frame(Germinacion_para_R)
data$propexitos <- (data$germinacion / data$Totalsemillas)#Proporción de semillas que germinaron
data$concentracion = as.factor(data$concentracion)#Concentración como factor
str(data)

## 'data.frame': 15 obs. of 4 variables:
## $ concentracion: Factor w/ 5 levels "0","50","100",...: 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4 ...
## $ germinacion : num 25 23 25 22 21 22 18 20 17 6 ...
## $ Totalsemillas: num 25 25 25 25 25 25 25 25 25 25 ...
## $ propexitos : num 1 0.92 1 0.88 0.84 0.88 0.72 0.8 0.68 0.24 ...

```

Modelo y Anova

```

M1 <- glm(propexitos ~ concentracion, family = binomial, weights = Totalsemillas, data = data)
#Modelo propuesto, modelo lineal generalizado familia binomial
summary(M1)

##
## Call:
## glm(formula = propexitos ~ concentracion, family = binomial,
##      data = data, weights = Totalsemillas)
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)      3.5973      0.7167   5.019 5.19e-07 ***
## concentracion50  -1.7255      0.7931  -2.176  0.0296 *
## concentracion100 -2.5857      0.7628  -3.390  0.0007 ***
## concentracion200 -4.8245      0.7680  -6.282 3.34e-10 ***
## concentracion250 -5.5897      0.8000  -6.987 2.80e-12 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
## Null deviance: 226.35 on 14 degrees of freedom
## Residual deviance: 16.78 on 10 degrees of freedom
## AIC: 64.587
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 5

anova_M1 <- anova(M1, test = "Chisq")#ANOVA para el modelo
print(anova_M1)

## Analysis of Deviance Table
##
## Model: binomial, link: logit
##
## Response: propexitos
##

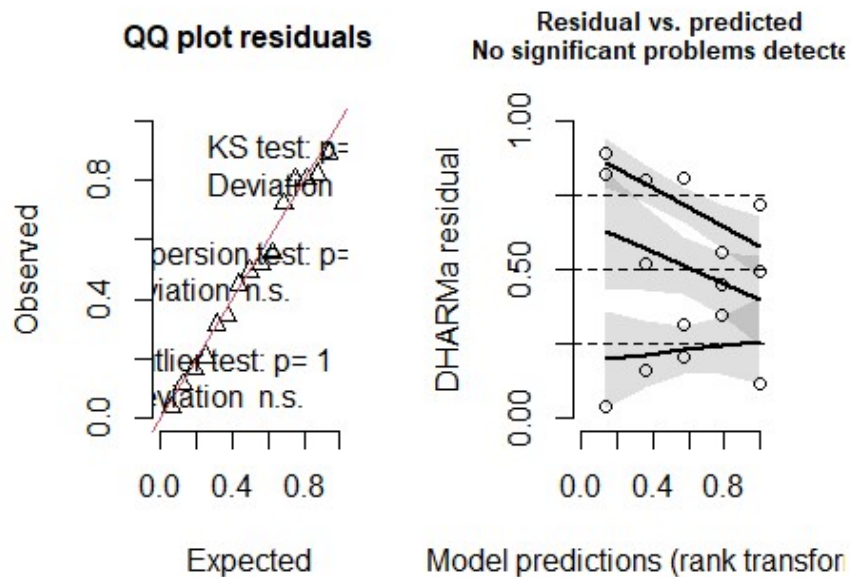
```

```
## Terms added sequentially (first to last)
##
##
##              Df Deviance Resid. Df Resid. Dev  Pr(>Chi)
## NULL                      14      226.35
## concentracion  4    209.57      10      16.78 < 2.2e-16 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

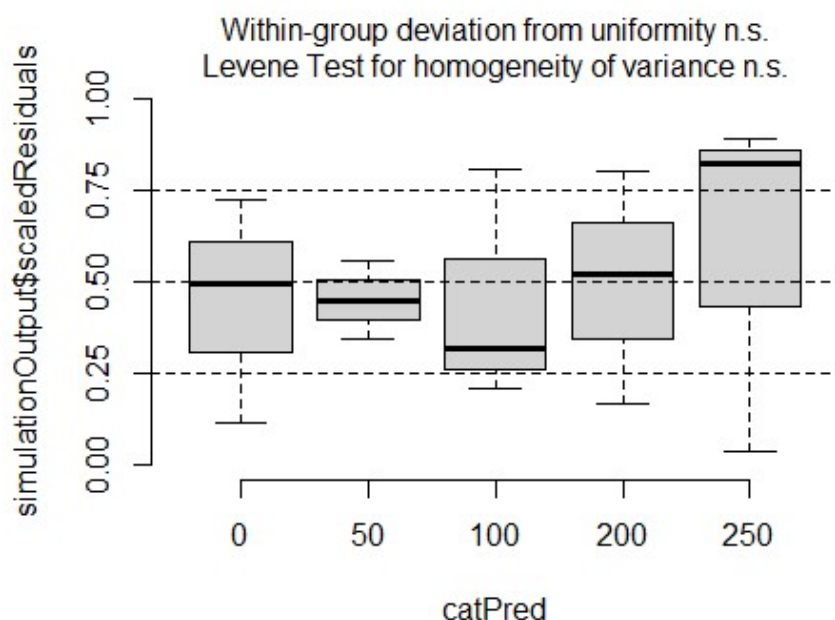
Supuestos del modelo

```
library(DHARMA)
sim <- simulateResiduals(fittedMod = M1, plot = T) #Chequeo de Los
supuestos del modelo con DHARMA
```

DHARMA residual



```
plotResiduals(sim, data$concentracion)
```



Tukey

```
library(emmeans)
compVR <- emmeans(M1, pairwise ~ concentracion, type = "response") #Tukey
summary(compVR)
```

```
## $emmeans
## concentracion prob SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0 0.973 0.0186 Inf 0.8996 0.993
## 50 0.867 0.0393 Inf 0.7696 0.927
## 100 0.733 0.0511 Inf 0.6224 0.821
## 200 0.227 0.0483 Inf 0.1458 0.335
## 250 0.120 0.0375 Inf 0.0636 0.215
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale
##
## $contrasts
## contrast odds.ratio SE df null
z.ratio
## concentracion0 / concentracion50 5.62 4.454 Inf 1
2.176
## concentracion0 / concentracion100 13.27 10.125 Inf 1
3.390
## concentracion0 / concentracion200 124.53 95.634 Inf 1
6.282
## concentracion0 / concentracion250 267.67 214.127 Inf 1
6.987
## concentracion50 / concentracion100 2.36 1.013 Inf 1
2.008
## concentracion50 / concentracion200 22.18 9.703 Inf 1
```

```

7.083
## concentracion50 / concentracion250      47.67  23.432 Inf    1
7.861
## concentracion100 / concentracion200      9.38   3.563 Inf    1
5.895
## concentracion100 / concentracion250     20.17   8.893 Inf    1
6.813
## concentracion200 / concentracion250      2.15   0.967 Inf    1
1.701
## p.value
## 0.1890
## 0.0063
## <.0001
## <.0001
## 0.2621
## <.0001
## <.0001
## <.0001
## <.0001
## <.0001
## 0.4332
##
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 5 estimates
## Tests are performed on the log odds ratio scale

```

Probabilidades y errores

```

probabilidades <- emmeans(M1, ~ concentracion, type = "response")
summary(probabilidades)

## concentracion prob      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0              0.973 0.0186 Inf    0.8996    0.993
## 50              0.867 0.0393 Inf    0.7696    0.927
## 100             0.733 0.0511 Inf    0.6224    0.821
## 200             0.227 0.0483 Inf    0.1458    0.335
## 250             0.120 0.0375 Inf    0.0636    0.215
##
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale

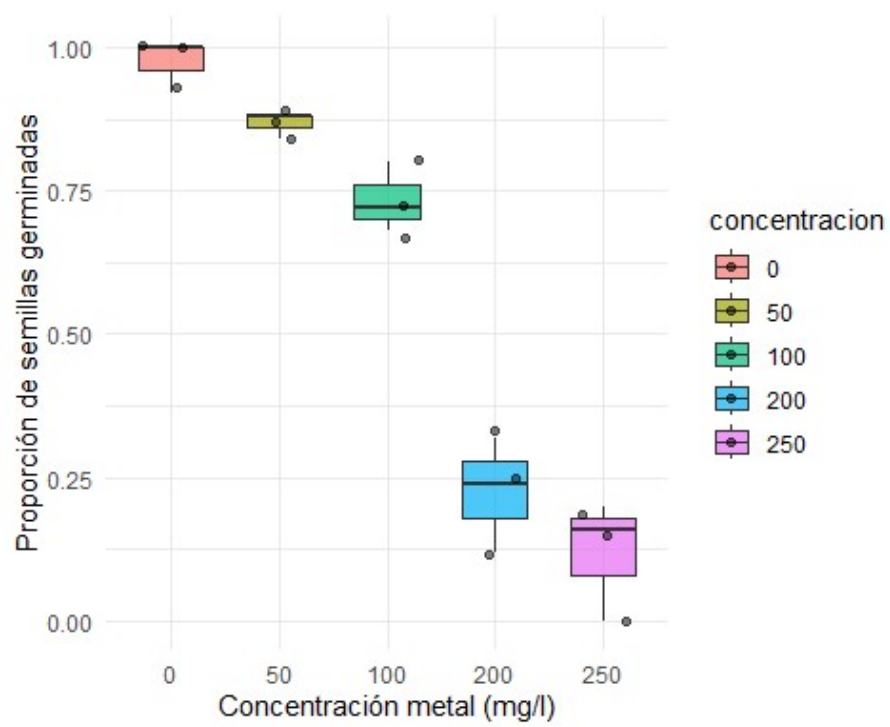
```

Gráfico

```

library(ggplot2)
ggplot(data, aes(x = concentracion, y = propexitos, fill =
concentracion)) +
geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5)+
xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Proporción de semillas
germinadas") + theme_minimal()

```



Tablas A4. Longitudes de vástago y raíz en ensayo de germinación de *Festuca arundinacea* con distintas concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
setwd("C:/Users/ailel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA  
UBACYT2022/Estadistica/Festuca")
```

```
pacman::p_load(#rio,  
lubridate,  
#nasapower,  
janitor,  
tidyverse,  
skimr,  
#see,  
#GGally,  
#correlation,  
ggcorrplot,  
viridis,  
performance,  
ggeffects,  
emmeans,  
multcomp,  
glmmTMB,  
MASS,  
lme4,  
multcompView,  
DHARMA,#para GLMM-inflados en ceros  
texreg,  
DescTools,  
agricolae,  
TH.data,  
mvtnorm,  
survival,  
lsmeans,  
dplyr,  
cars  
)
```

```
## Installing package into 'C:/Users/ailel/AppData/Local/R/win-  
library/4.3'
```

```
## (as 'lib' is unspecified)
```

Análisis del vástago en ensayo de germinación con cobre

```
library(readxl)  
AnovaFestucaVastagocu <-  
read_excel("LongitudVastagopromediadoFestucaconcu.xlsx")  
datavastago = data.frame(AnovaFestucaVastagocu)  
datavastago$concl=as.factor(datavastago$concl)#Concentración de metal  
como factor  
datavastago$caja1=as.factor(datavastago$caja1)#Número de caja como factor  
str(datavastago)
```

```
## 'data.frame': 14 obs. of 3 variables:
## $ caja1 : Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 ...
## $ conc1 : Factor w/ 5 levels "0","50","100",...: 1 1 1 2 2 2 3 3 3 4
## $ Media1: num 1.118 1.978 1.604 1.427 0.976 ...
```

Modelo y Anova

```
library(nlme)

##
## Attaching package: 'nlme'

## The following object is masked from 'package:lme4':
##
## lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## collapse

anova_mv<-gls(Media1 ~ conc1, data = datavastago)#Ajuste de modelo lineal
usando cuadrados mínimos generalizados
anova(anova_mv)

## Denom. DF: 9
##          numDF    F-value p-value
## (Intercept)      1 193.38173  <.0001
## conc1            4   5.15516  0.0194
```

Supuestos del modelo

```
resid_mv<-resid(anova_mv)
pred_mv <- predict(anova_mv)
shapiro.test(resid_mv)# Prueba de normalidad

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data: resid_mv
## W = 0.95546, p-value = 0.6482

library(car)

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
## Recode

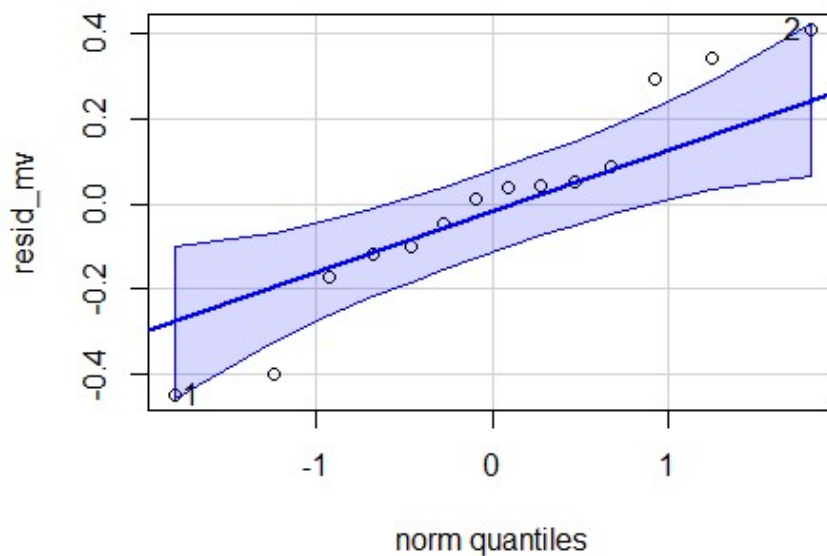
## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## recode
```

```
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

leveneTest(datavastago$Media1 ~ datavastago$concl1)#Prueba de
homocedasticidad

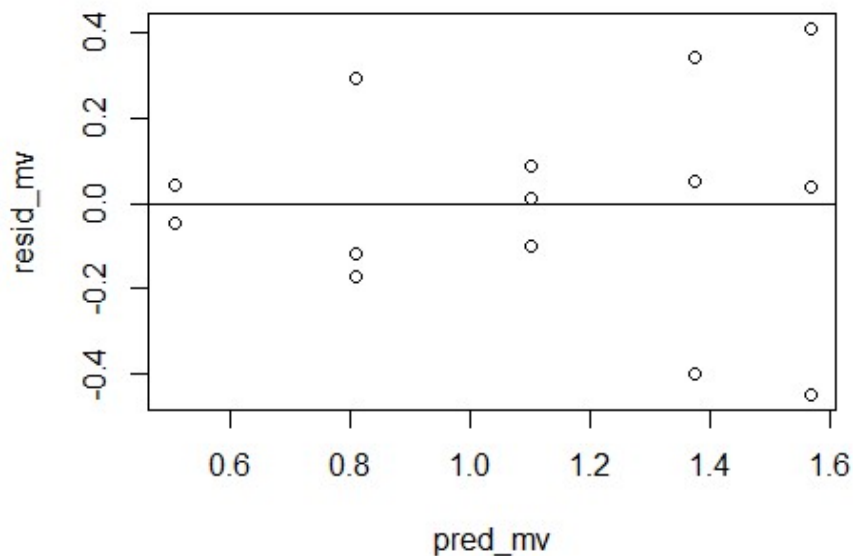
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group  4  0.8228 0.5424
##      9

library(car)
qqPlot(resid_mv)
```



```
## [1] 1 2

plot(pred_mv, resid_mv)
abline(0,0)
```



Modelado de

varianza

```
# Modelo con varIdent
varIdent_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varIdent(form = ~ 1 |
conc1), data = datavastago)
pred_varIdent <- fitted(varIdent_model)
residStd_varIdent <- resid(varIdent_model, type = "pearson")

# Modelo con varExp
varExp_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varExp(form = ~ fitted(.)),
data = datavastago)
pred_varExp <- fitted(varExp_model)
residStd_varExp <- resid(varExp_model, type = "pearson")

# Modelo con varPower
varPower_model <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varPower(form = ~
fitted(.)), data = datavastago)
pred_varPower <- fitted(varPower_model)
residStd_varPower <- resid(varPower_model, type = "pearson")

# Comparación de Los modelos usando AIC
AIC(varIdent_model, varExp_model, varPower_model)

##           df      AIC
## varIdent_model 10 22.96185
## varExp_model    7 20.41949
## varPower_model  7 20.26895
```

Anova con varianza modelada

```
anova(varPower_model)#Elegí el modelo con menor valor de AIC
```

```
## Denom. DF: 9
##          numDF    F-value p-value
## (Intercept)      1 209.25069 <.0001
## conc1            4   9.51763 0.0027
```

Tukey

```
library(multcomp)
tukey_result <- glht(varPower_model, linfct = mcp(conc1 =
"Tukey"))#Contrastes entre tratamientos
summary(tukey_result)

##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
##
##
## Fit: gls(model = Media1 ~ conc1, data = datavastago, weights =
varPower(form = ~fitted(.)))
##
## Linear Hypotheses:
##          Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## 50 - 0 == 0    -0.1929     0.3135  -0.615  0.97007
## 100 - 0 == 0   -0.4664     0.2844  -1.640  0.44988
## 200 - 0 == 0   -0.7598     0.2610  -2.911  0.02674 *
## 250 - 0 == 0   -1.0618     0.2495  -4.255 < 0.001 ***
## 100 - 50 == 0  -0.2735     0.2551  -1.072  0.80757
## 200 - 50 == 0  -0.5669     0.2287  -2.479  0.08702 .
## 250 - 50 == 0  -0.8689     0.2155  -4.032 < 0.001 ***
## 200 - 100 == 0 -0.2934     0.1868  -1.571  0.49458
## 250 - 100 == 0 -0.5954     0.1704  -3.494  0.00391 **
## 250 - 200 == 0 -0.3019     0.1276  -2.366  0.11455
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)

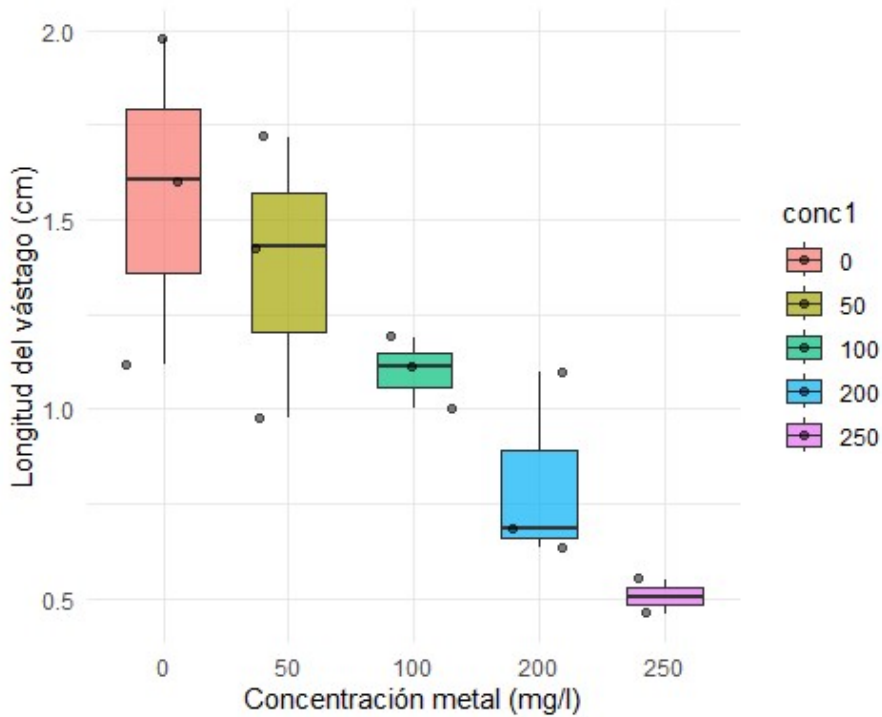
emmeans_res <- emmeans(varPower_model, ~ conc1)#Medias para cada
tratamiento
emmeans_res

##   conc1 emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## 0      1.567 0.2388 3.88   0.8954  2.238
## 50     1.374 0.2030 5.74   0.8716  1.876
## 100    1.100 0.1544 8.94   0.7508  1.450
## 200     0.807 0.1052 5.21   0.5397  1.074
## 250     0.505 0.0722 1.47   0.0563  0.954
##
## Degrees-of-freedom method: satterthwaite
## Confidence level used: 0.95
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
ggplot(datavastago, aes(x = conc1, y = Media1, fill = conc1)) +
```

```
geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5) +
xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Longitud del vástago (cm)") +
theme_minimal() # Puedes ajustar el tema según tus preferencias
```



Análisis de la

raíz en ensayo de germinación con cobre

```
AnovaFestucaRaizcu <-
read_excel("LongitudRaizpromediadaFestucaconcu.xlsx")
dataaraiz = data.frame(AnovaFestucaRaizcu)
dataaraiz$conc1=as.factor(dataaraiz$conc1)#Concentración de metal como
factor
dataaraiz$caja1=as.factor(dataaraiz$caja1)#Número de caja como factor
str(dataaraiz)

## 'data.frame': 9 obs. of 3 variables:
## $ caja1 : Factor w/ 3 levels "1","2","3": 1 2 3 1 2 3 1 2 3
## $ conc1 : Factor w/ 3 levels "0","50","100": 1 1 1 2 2 2 3 3 3
## $ Media1: num 1.036 1.1522 1.276 0.1273 0.0148 ...
```

Anova

```
library(nlme)
anova_mvraiz<-glm(Media1 ~ conc1, data = dataaraiz)#Ajuste de modelo
lineal usando cuadrados mínimos generalizados
anova(anova_mvraiz)

## Denom. DF: 6
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)    1 262.3080 <.0001
## conc1          2 206.2269 <.0001
```

Supuestos del modelo

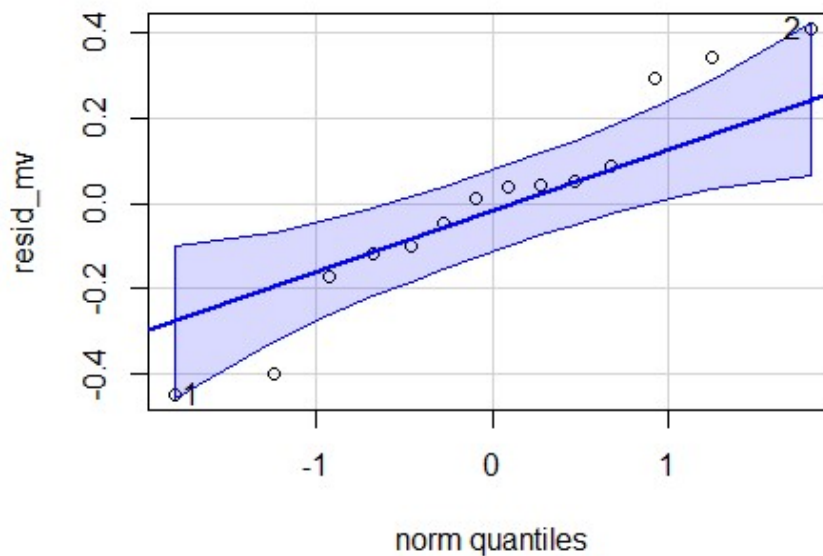
```
resid_mvraiz<-resid(anova_mvraiz)
pred_mvraiz <- predict(anova_mvraiz)
shapiro.test(resid_mvraiz)# Prueba de normalidad

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  resid_mvraiz
## W = 0.95719, p-value = 0.7685

library(car)
leveneTest(dataaiz$Media1 ~ dataaiz$concl1)# Prueba de homocedasticidad

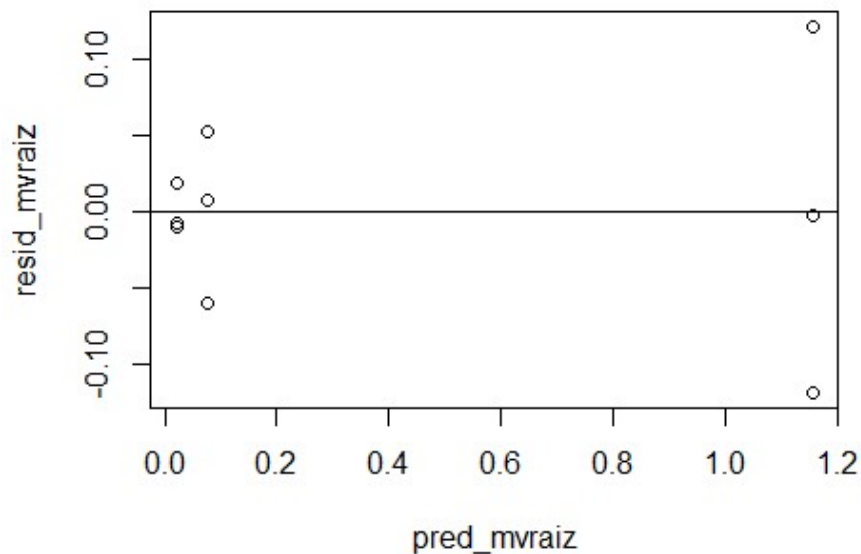
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 2  1.8234 0.2406
##      6

library(car)
qqPlot(resid_mv)
```



```
## [1] 1 2

plot(pred_mvraiz, resid_mvraiz)
abline(0,0)
```



Modelado de varianza

```
# Modelo con varIdent
varIdent_model2 <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varIdent(form = ~ 1 |
conc1), data = dataaraiz)
pred_varIdent2 <- fitted(varIdent_model2)
residStd_varIdent2 <- resid(varIdent_model2, type = "pearson")

# Modelo con varExp
varExp_model2 <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varExp(form = ~
fitted(.)), data = dataaraiz)
pred_varExp2 <- fitted(varExp_model2)
residStd_varExp2 <- resid(varExp_model2, type = "pearson")

# Modelo con varPower
varPower_model2 <- gls(Media1 ~ conc1, weights = varPower(form = ~
fitted(.)), data = dataaraiz)
pred_varPower2 <- fitted(varPower_model2)
residStd_varPower2 <- resid(varPower_model2, type = "pearson")

# Comparación de los modelos usando AIC
AIC(varIdent_model2, varExp_model2, varPower_model2)

##           df          AIC
## varIdent_model2    6 -4.183359
## varExp_model2      5 -3.777492
## varPower_model2    5 -5.168850
```

Anova con varianza modelada

```
anova(varPower_model2)#Elegí el modelo con menor valor de AIC
```

```
## Denom. DF: 6
##          numDF  F-value p-value
## (Intercept)    1 23.88459  0.0027
## conc1          2 96.62228  <.0001
```

Tukey

```
library(multcomp)
tukey_resultraiz <- glht(varPower_model2, linfct = mcp(conc1 =
"Tukey"))#Contrastes entre tratamientos
summary(tukey_resultraiz)

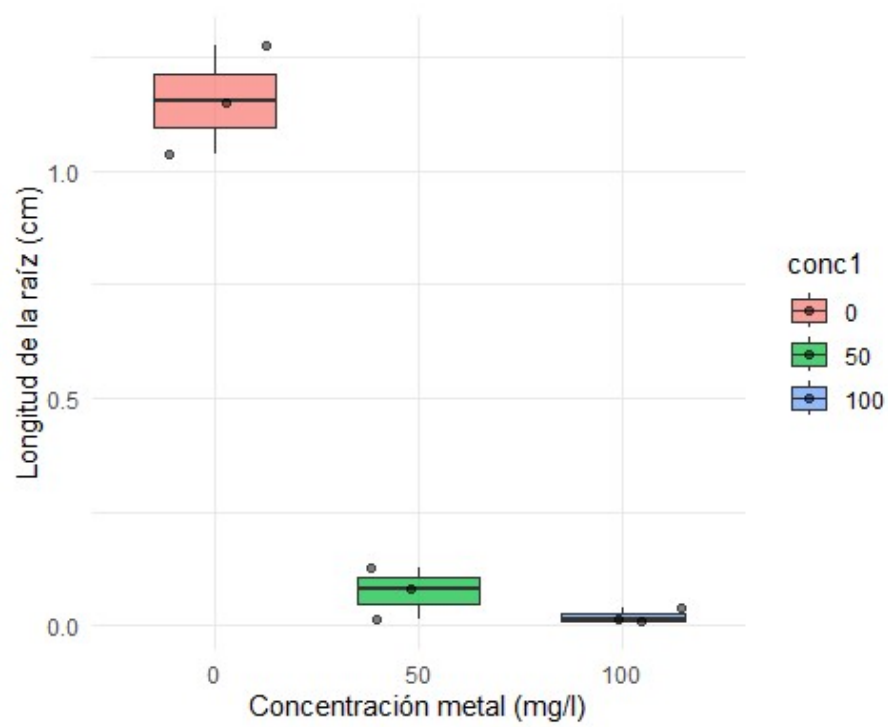
##
## Simultaneous Tests for General Linear Hypotheses
##
## Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts
##
##
## Fit: gls(model = Media1 ~ conc1, data = dataaraiz, weights =
varPower(form = ~fitted(.)))
##
## Linear Hypotheses:
##          Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## 50 - 0 == 0   -1.08011    0.08414 -12.838  <1e-05 ***
## 100 - 0 == 0  -1.13426    0.08173 -13.879  <1e-05 ***
## 100 - 50 == 0 -0.05415    0.02792  -1.939    0.115
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
## (Adjusted p values reported -- single-step method)

emmeans_resraiz <- emmeans(varPower_model2, ~ conc1)#Medias para cada
tratamiento
emmeans_resraiz

## conc1 emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## 0      1.1547 0.0806 1.61   0.7139  1.5955
## 50     0.0746 0.0243 5.34   0.0134  0.1359
## 100    0.0205 0.0138 2.23  -0.0333  0.0742
##
## Degrees-of-freedom method: satterthwaite
## Confidence level used: 0.95
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
ggplot(dataaraiz, aes(x = conc1, y = Media1, fill = conc1)) +
geom_boxplot(width = 0.6, alpha = 0.7) +
geom_jitter(position = position_jitter(width = 0.3), alpha = 0.5) +
xlab("Concentración metal (mg/l)") + ylab("Longitud de la raíz (cm)") +
theme_minimal()
```



Tablas A5. Supervivencia de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
lubridate,
#nasapower,
janitor,
tidyverse,
skimr,
#see,
#GGally,
#correlation,
ggcorrplot,
viridis,
performance,
ggeffects,
emmeans,
multcomp,
glmmTMB,
MASS,
lme4,
multcompView,
DHARMA,#para GLMM-inflados en ceros
texreg,
DescTools,
agricolae,
TH.data,
mvtnorm,
survival,
lsmeans,
dplyr,
cars
)

## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)
```

Librerías y asignación de nombres y tipos de datos en Dataframe

```
setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadística/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Supervivencia.xlsx")

library(dplyr)
datos <- datos %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "Sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
```

```

    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
str(datos)

## tibble [108 × 3] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Concentracion: num [1:108] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
## $ Bacteria      : chr [1:108] "Sin inocular" "Sin inocular" "Sin
inocular" "Sin inocular" ...
## $ Supervivencia: num [1:108] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...

class(datos$Concentracion)

## [1] "numeric"

datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion)
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("Sin inocular",
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
# Convertir a caracteres y luego a factores, asegurando que todos los
niveles estén presentes
datos$Bacteria <- as.factor(as.character(datos$Bacteria))

# Revisar los niveles
levels(datos$Bacteria)

## [1] "31A6TWB2.1" "44A7TWB1.1" "Sin inocular"

library(pastecs)          # descriptiva

##
## Attaching package: 'pastecs'

## The following object is masked from 'package:texreg':
##
##   extract

## The following objects are masked from 'package:dplyr':
##
##   first, last

## The following object is masked from 'package:tidyr':
##
##   extract

library(ggplot2)          # graficos
library(gridExtra)        # para plotear multiples graficos

##
## Attaching package: 'gridExtra'

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##   combine

library(ResourceSelection) # para evaluar bondad de ajuste

## ResourceSelection 0.3-6    2023-06-27

```

```
library(car) # p/ Anova

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##      Recode

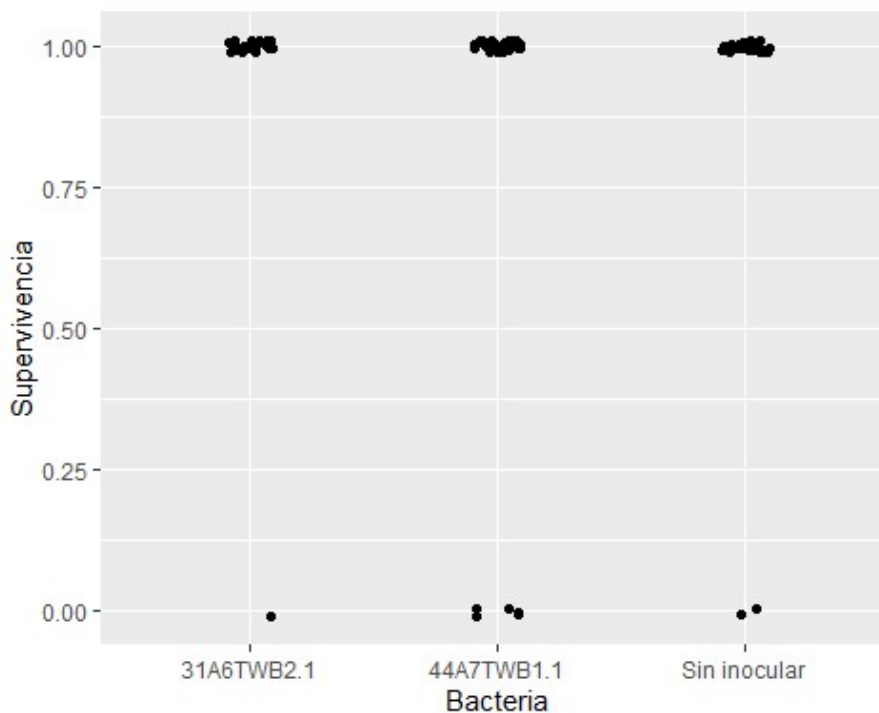
## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      recode

## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

library(emmeans) # comparaciones
library(ggeffects) # grafico predicciones del modelo
library(DHARMA) # analisis supuestos
```

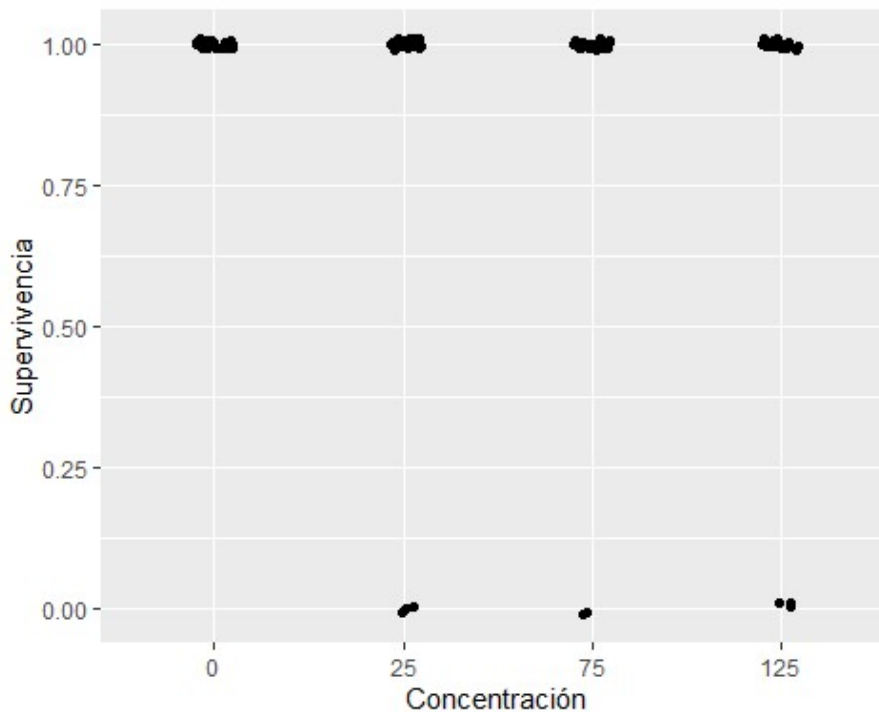
Gráficos

```
ggplot(datos, aes(x = Bacteria, y = Supervivencia)) + geom_jitter(height
= 0.01, width = 0.1)
```



```
# en fc de La Concentracion:
ggplot(datos, aes(x=Concentracion, y= Supervivencia)) +
geom_jitter(height = 0.01, width = 0.1) +
```

```
xlab("Concentración") +
ylab("Supervivencia")
```



```
# Cargar Librerías necesarias
library(dplyr)
library(knitr)

# Calcular porcentaje de supervivencia por nivel de Bacteria y
Concentracion
tabla_supervivencia <- datos %>%
  group_by(Bacteria, Concentracion) %>%
  summarize(
    Total = n(),
    Supervivientes = sum(Supervivencia),
    Porcentaje = round((Supervivientes / Total) * 100, 2)
  ) %>%
  arrange(factor(Bacteria, levels = c("Sin inocular", "31A6TWB2.1",
"44A7TWB1.1")), Concentracion)

## `summarise()` has grouped output by 'Bacteria'. You can override using
the
## `.groups` argument.

# Mostrar la tabla en formato de markdown adecuado para Word con rayas en
Las columnas
kable(tabla_supervivencia, caption = "Porcentaje de Supervivencia por
Nivel de Tratamiento", format = "pandoc",
  col.names = c("Bacteria", "Concentración", "Total",
"Supervivientes", "Porcentaje"),
  linesep = c("", "", "", ""))
```

Porcentaje de Supervivencia por Nivel de Tratamiento

Bacteria	Concentración (mg/l)	Total	Supervivientes	Porcentaje (%)
Sin inocular	0	9	9	100.00
Sin inocular	25	9	9	100.00
Sin inocular	75	9	8	88.89
Sin inocular	125	9	8	88.89
31A6TWB2.1	0	9	9	100.00
31A6TWB2.1	25	9	9	100.00
31A6TWB2.1	75	9	8	88.89
31A6TWB2.1	125	9	9	100.00
44A7TWB1.1	0	9	9	100.00
44A7TWB1.1	25	9	6	66.67
44A7TWB1.1	75	9	9	100.00
44A7TWB1.1	125	9	7	77.78

Paso el nivel SIN bacteria a la intercept

```
datos$Bacteria=as.factor(datos$Bacteria)
levels(datos$Bacteria)

## [1] "31A6TWB2.1" "44A7TWB1.1" "Sin inocular"

datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria,levels = c("Sin inocular",
"31A6TWB2.1","44A7TWB1.1"))#el primer nivel será el que quede en el
intercept
levels(datos$Bacteria)

## [1] "Sin inocular" "31A6TWB2.1" "44A7TWB1.1"
```

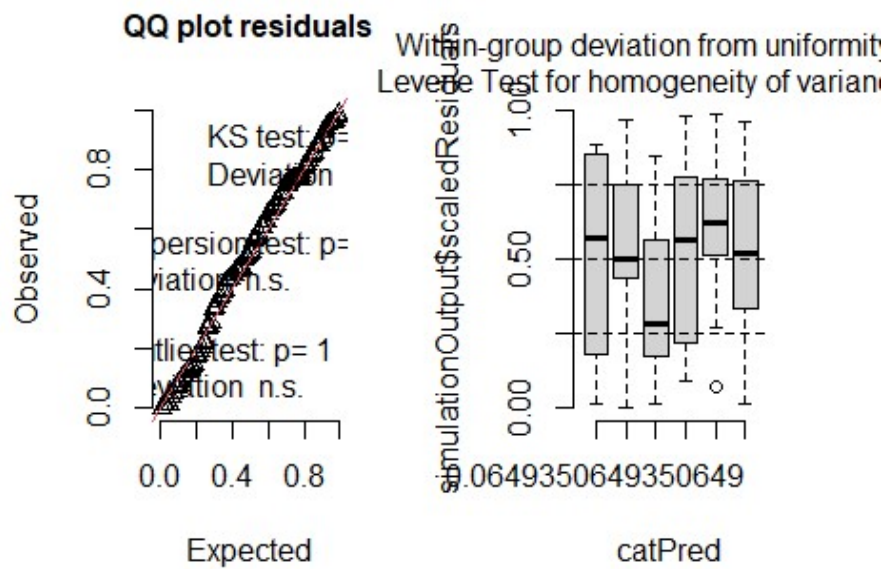
Modelo binomial

```
m_con_int <- glm(Supervivencia ~ Bacteria*Concentracion,data =datos,
family = binomial)#Modelo lineal generalizado familia binomial
```

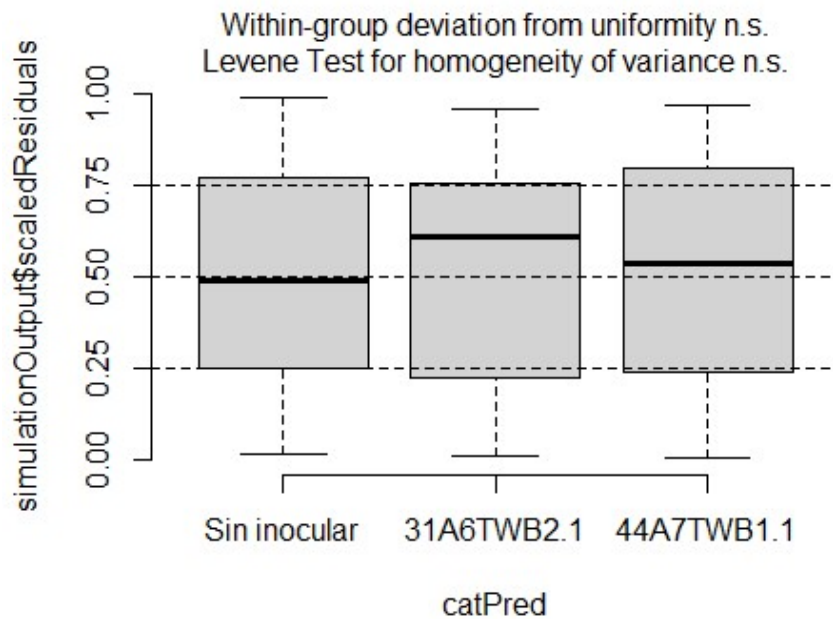
Chequeo de supuestos del modelo

```
library(DHARMA)
sim <- simulateResiduals(fittedModel = m_con_int, plot = T)
```

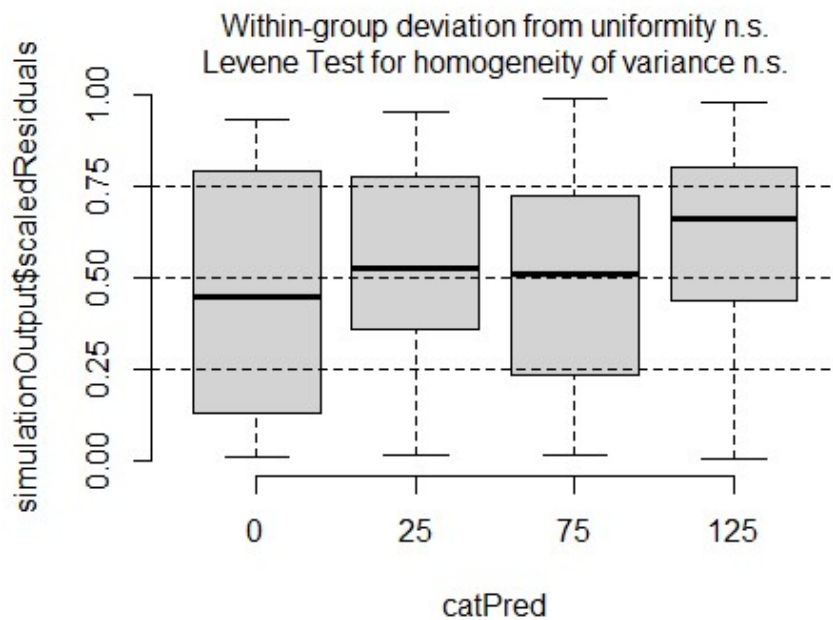
DHARMA residual



```
plotResiduals(sim, datos$Bacteria)
```



```
plotResiduals(sim, datos$Concentracion)
```



ANOVA

```
Anova(m_con_int)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: Supervivencia
##
##          LR Chisq Df Pr(>Chisq)
## Bacteria      3.5476 2    0.1697
## Concentracion  5.2140 3    0.1568
## Bacteria:Concentracion 8.5561 6    0.2001
```

Comparaciones de medias marginales

```
compVR <- emmeans(m_con_int, pairwise ~ Bacteria, type = "response")
```

```
## NOTE: Results may be misleading due to involvement in interactions
```

```
summary(compVR)
```

```
## $emmeans
## Bacteria prob SE df asymp.LCL asymp.UCL
## Sin inocular 1 0.0252715 Inf 2.22e-16 1
## 31A6TWB2.1 1 0.0003045 Inf 2.22e-16 1
## 44A7TWB1.1 1 0.0439434 Inf 2.22e-16 1
##
## Results are averaged over the levels of: Concentracion
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the logit scale
##
## $contrasts
## contrast odds.ratio SE df null z.ratio
```

```

p.value
## Sin inocular / 31A6TWB2.1  9.84e-03    32.5 Inf    1  -0.001
1.0000
## Sin inocular / 44A7TWB1.1  1.74e+00   5138.5 Inf    1   0.000
1.0000
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1    1.77e+02 584052.7 Inf    1   0.002
1.0000
##
## Results are averaged over the levels of: Concentracion
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
## Tests are performed on the log odds ratio scale

```

Tablas A6. Número de macollos de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMA, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

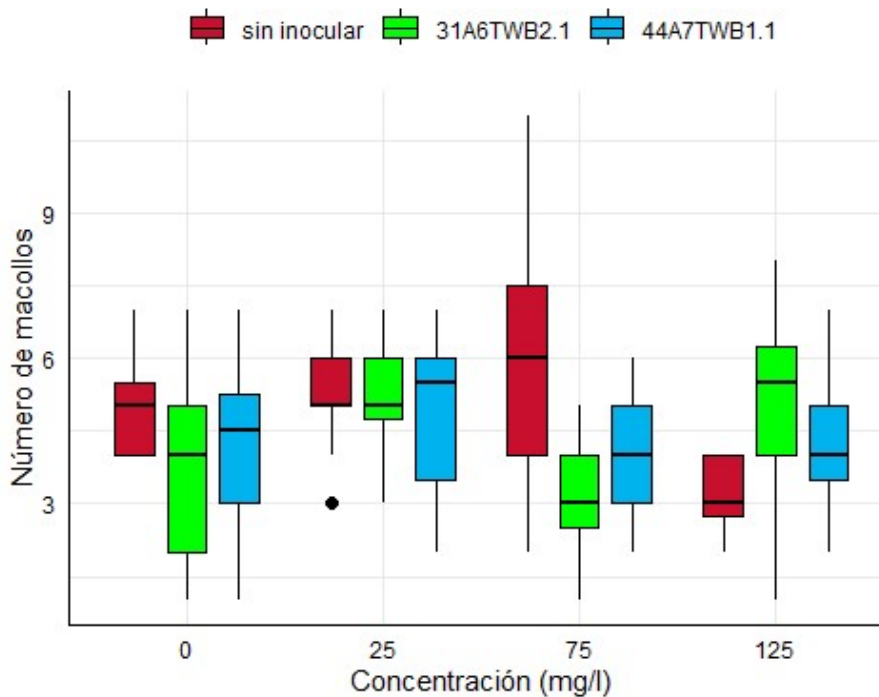
## Installing package into 'C:/Users/ailen/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/ailen/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
plantas <- read_excel("Numeromacollos.xlsx")
library(dplyr)
plantas <- plantas %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
plantas$Bacteria <- factor(plantas$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
plantas$Concentracion <- as.factor(plantas$Concentracion)
plantas$Semanacovariable <- as.factor(plantas$Semanacovariable)
```

Gráficos

```
library(ggplot2)
library(ggpubr)
ggplot(plantas, aes(x = Concentracion, y = Numeromacollos, fill =
Bacteria)) +
  geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
               outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
               colour = "black", lwd = 0.5) +
  scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1" =
"#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
  scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1"
= "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
  labs(x = "Concentración (mg/l)",
       y = "Número de macollos") +
  theme_minimal() +
  theme(legend.position = "top",
        legend.title = element_blank(),
        axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
        axis.text = element_text(colour = "black"),
        axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo Poisson

```

m2 <- glm(Numeromacollos ~ Concentracion * Bacteria + Semanacovariable,
data = plantas, family = poisson)
summary(m2)

##
## Call:
## glm(formula = Numeromacollos ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable,
##     family = poisson, data = plantas)
##
## Coefficients:
##
## Estimate Std. Error z value
Pr(>|z|)
## (Intercept)
16 *** 1.56302 0.17884 8.740 <2e-
## Concentracion25
0.7373 0.07467 0.22262 0.335
## Concentracion75
0.4257 0.18232 0.22887 0.797
## Concentracion125
0.0763 . -0.46432 0.26196 -1.773
## Bacteria31A6TWB2.1
0.2030 -0.30889 0.24264 -1.273
## Bacteria44A7TWB1.1
0.5150 -0.15683 0.24090 -0.651
## Semanacovariableb
0.4193 0.07987 0.09889 0.808
## Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
0.3947 0.27463 0.32268 0.851
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
0.3623 -0.32633 0.35818 -0.911
## Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
0.0221 * 0.80359 0.35109 2.289
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
0.8728 0.05395 0.33683 0.160
## Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
0.4549 -0.24737 0.33106 -0.747
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
0.1868 0.47840 0.36238 1.320
## ---
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
##
## Null deviance: 74.395 on 92 degrees of freedom
## Residual deviance: 58.269 on 80 degrees of freedom
## AIC: 389.16
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4

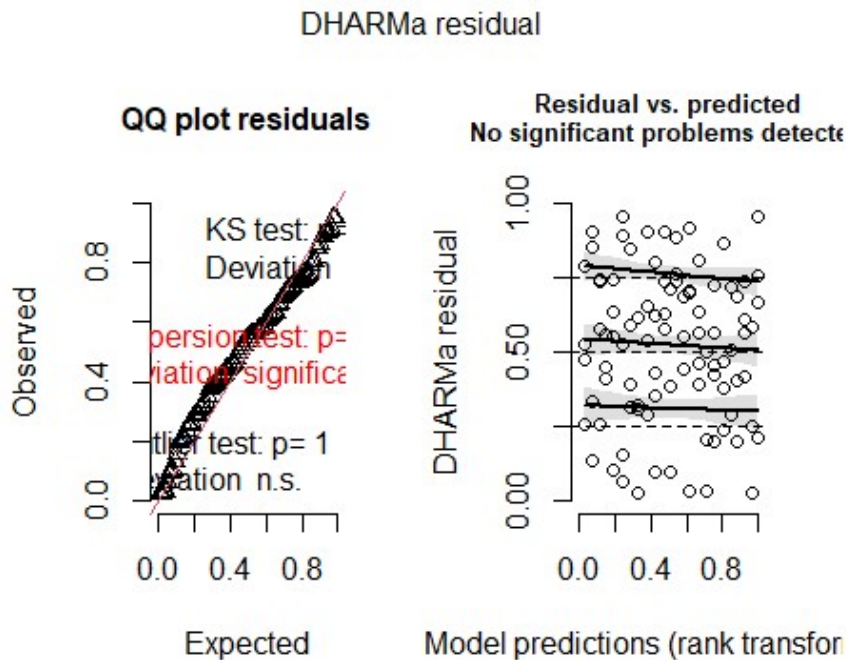
```

Chequeo supuestos Poisson

```
dispersion <- sum(resid(m2, type = "pearson")^2) / m2$df.residual#La
varianza tiene que coincidir con la media, lambda
dispersion

## [1] 0.6778494

sim <- simulateResiduals(m2, n = 1000)#con el dharma se da si es
significativo o no la desviacion
plot(sim)
```



Modelo COM-Poisson

```
library(glmTMB)
m2_com <- glmTMB(Numeromacollos ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovvariable, data=plantas, family = compois)
summary(m2_com)

## Family: compois ( log )
## Formula: Numeromacollos ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovvariable
## Data: plantas
##
##      AIC      BIC   logLik deviance df.resid
##  380.6    416.1   -176.3    352.6      79
##
## Dispersion parameter for compois family (:): 0.575
##
## Conditional model:
##
## Estimate Std. Error z value
Pr(>|z|)
```

```
## (Intercept)          1.56275    0.13871   11.266 < 2e-
16 ***
## Concentracion25      0.07491    0.17245    0.434
0.66402
## Concentracion75      0.18277    0.17706    1.032
0.30195
## Concentracion125     -0.46422    0.20478   -2.267
0.02339 *
## Bacteria31A6TWB2.1   -0.30865    0.18890   -1.634
0.10227
## Bacteria44A7TWB1.1   -0.15603    0.18706   -0.834
0.40420
## Semanacovariableb     0.08020    0.07684    1.044
0.29661
## Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1  0.27410    0.25062    1.094
0.27410
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1 -0.32716    0.27939   -1.171
0.24160
## Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1  0.80323    0.27397    2.932
0.00337 **
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1  0.05233    0.26141    0.200
0.84133
## Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1 -0.24864    0.25701   -0.967
0.33333
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1  0.47726    0.28265    1.689
0.09130 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

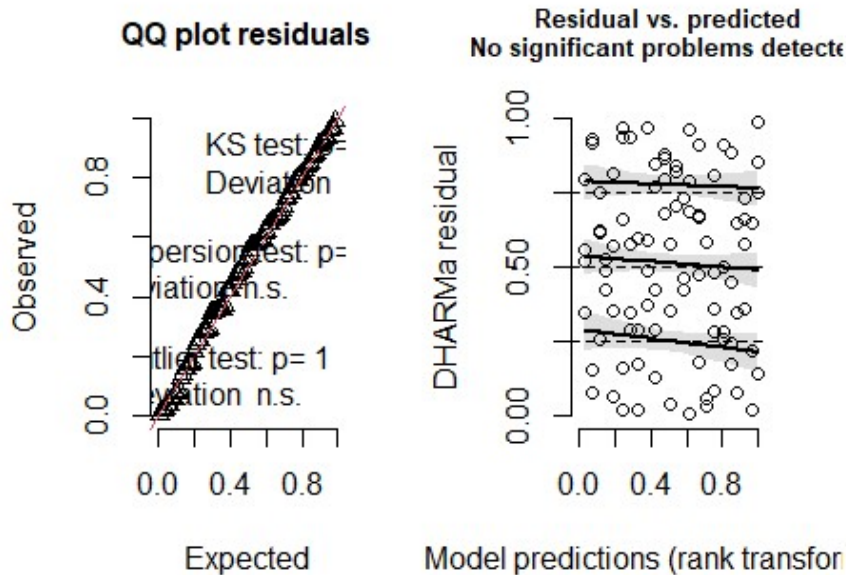
Chequeo supuestos COM-Poisson

```
residuals_m2_com <- residuals(m2_com, type = "pearson")
dispersion_test <- sum(residuals_m2_com^2) / df.residual(m2_com)
cat("Estadística de prueba de sobredispersión:", dispersion_test, "\n")

## Estadística de prueba de sobredispersión: 1.134461

simulationOutput <- simulateResiduals(fittedModel = m2_com)
plot(simulationOutput)
```

DHARMA residual



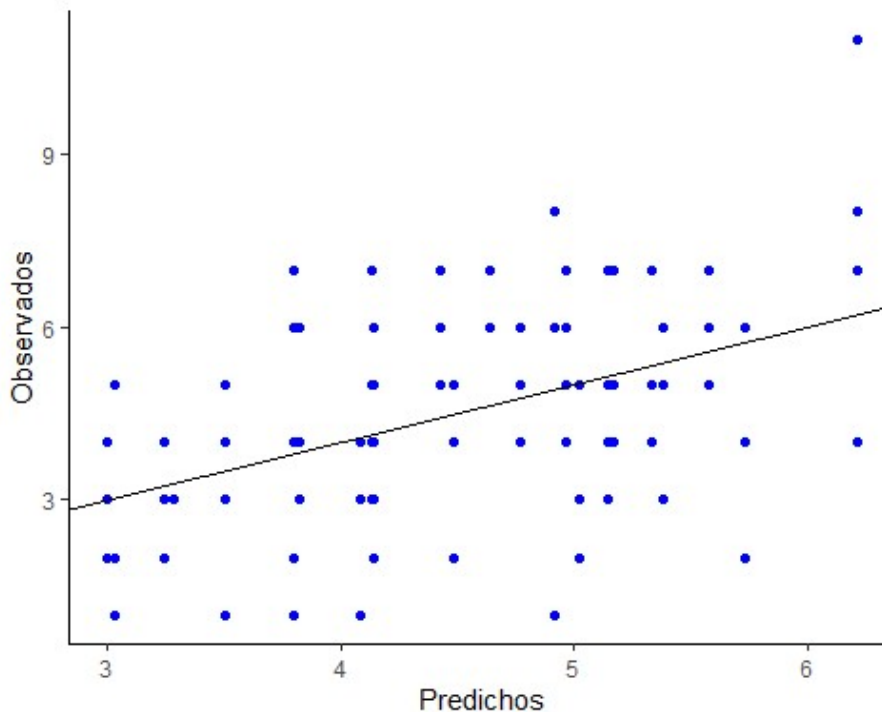
```
Predichos <- predict(m2_com, type = "response")
print(Predichos)

## [1] 2.999752 2.999752 2.999752 2.999752 4.919020 4.919020 4.919020
## [9] 4.136130 4.136130 4.136130 4.136130 5.728879 5.728879 5.728879
## [17] 3.033482 3.033482 3.033482 3.822284 3.822284 3.822284 3.822284
## [25] 5.143118 5.143118 5.143118 5.143118 4.968445 4.968445 4.968445
## [33] 4.968445 4.636484 4.636484 4.636484 4.771927 4.771927 4.771927
## [41] 3.504684 3.504684 4.082529 4.082529 4.082529 4.082529 3.504684
## [49] 5.170425 5.170425 3.797356 3.797356 3.797356 3.797356 3.797356
## [57] 4.423456 4.423456 4.423456 5.170425 5.572614 5.572614 5.572614
## [65] 5.383354 5.383354 5.383354 5.023672 5.023672 5.023672 6.207290
## [73] 6.207290 6.207290 3.286805 3.286805 3.286805 4.141478 4.141478
## [81] 4.141478 4.141478 3.250258 3.250258 3.250258 3.250258 5.329802
## [89] 5.329802 5.329802 4.481533 4.481533 4.481533

Observados<- plantas$Numeromacollos
Observados
```

```
## [1] 2 3 4 3 6 8 1 6 7 5 3 4 4 6 2 5 5 1 2 3 3 6
4 5 5
## [26] 4 7 3 4 6 7 5 5 7 6 6 5 6 4 4 1 5 1 4 3 3 3
5 4 7
## [51] 1 4 2 7 6 7 6 5 5 4 6 6 7 5 6 3 5 2 3 5 7 8
11 4 3
## [76] 3 3 6 5 4 2 3 3 4 2 4 4 4 7 5 4 5 2
```

```
graf <- data.frame(Predichos = Predichos, Observados = Observados)
ggplot(data = graf, aes(x = Predichos, y = Observados)) +
  geom_point(colour = "blue") +
  ylab("Observados") + xlab("Predichos") +
  geom_abline(intercept = 0, slope = 1) +
  theme_classic()
```



Anova con COM-Poisson

```
library(car)

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
## Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## recode
```

```
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

Anova(m2_com)

## Analysis of Deviance Table (Type II Wald chisquare tests)
##
## Response: Numeromacollos
##              Chisq Df Pr(>Chisq)
## Concentracion    3.8420  3    0.27904
## Bacteria          2.3045  2    0.31592
## Semanacovariable  1.0894  1    0.29661
## Concentracion:Bacteria 17.8416  6    0.00664 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Medias y Comparaciones entre tratamientos

```
compVR <- emmeans(m2_com, ~ Concentracion * Bacteria, type = "response")
compVR

##   Concentracion Bacteria      response      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0              sin inocular    4.97 0.652 Inf      3.84      6.42
## 25             sin inocular    5.35 0.598 Inf      4.30      6.66
## 75             sin inocular    5.96 0.711 Inf      4.72      7.53
## 125            sin inocular    3.12 0.491 Inf      2.29      4.25
## 0              31A6TWB2.1     3.65 0.497 Inf      2.79      4.76
## 25             31A6TWB2.1     5.17 0.627 Inf      4.08      6.56
## 75             31A6TWB2.1     3.16 0.530 Inf      2.27      4.39
## 125            31A6TWB2.1     5.12 0.620 Inf      4.04      6.49
## 0              44A7TWB1.1     4.25 0.567 Inf      3.27      5.52
## 25             44A7TWB1.1     4.83 0.696 Inf      3.64      6.40
## 75             44A7TWB1.1     3.98 0.518 Inf      3.08      5.13
## 125            44A7TWB1.1     4.31 0.612 Inf      3.26      5.69
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale

compVRpares1 <- emmeans(m2_com, pairwise ~ Concentracion | Bacteria, type
= "response")
compVRpares1

## $emmeans
## Bacteria = sin inocular:
##   Concentracion response      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0              4.97 0.652 Inf      3.84      6.42
## 25             5.35 0.598 Inf      4.30      6.66
## 75             5.96 0.711 Inf      4.72      7.53
## 125            3.12 0.491 Inf      2.29      4.25
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
##   Concentracion response      SE df asymp.LCL asymp.UCL
## 0              3.65 0.497 Inf      2.79      4.76
```

```

## 25          5.17 0.627 Inf      4.08      6.56
## 75          3.16 0.530 Inf      2.27      4.39
## 125         5.12 0.620 Inf      4.04      6.49
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## 0          4.25 0.567 Inf      3.27      5.52
## 25         4.83 0.696 Inf      3.64      6.40
## 75         3.98 0.518 Inf      3.08      5.13
## 125        4.31 0.612 Inf      3.26      5.69
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
##
## $contrasts
## Bacteria = sin inocular:
## contrast                ratio      SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  0.928 0.160 Inf      1  -0.434
0.9726 (pvalor x 2 = 1.9452)

## Concentracion0 / Concentracion75  0.833 0.147 Inf      1  -1.032
0.7305 (pvalor x 2 = 1.461)
## Concentracion0 / Concentracion125 1.591 0.326 Inf      1   2.267
0.1058 (pvalor x 2 = 0.2116)
## Concentracion25 / Concentracion75  0.898 0.147 Inf      1  -0.660
0.9122
## Concentracion25 / Concentracion125 1.715 0.331 Inf      1   2.794
0.0267 (pvalor x 2 = 0.0534)
## Concentracion75 / Concentracion125 1.910 0.377 Inf      1   3.278
0.0058 (pvalor x 2 = 0.0116)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                ratio      SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  0.705 0.129 Inf      1  -1.911
0.2232 (pvalor x 2 = 0.4464)
## Concentracion0 / Concentracion75  1.155 0.250 Inf      1   0.668
0.9091 (pvalor x 2 = 1.8182)
## Concentracion0 / Concentracion125  0.712 0.130 Inf      1  -1.861
0.2448 (pvalor x 2 = 0.4896)
## Concentracion25 / Concentracion75  1.638 0.339 Inf      1   2.386
0.0798 (pvalor x 2 = 0.1596)
## Concentracion25 / Concentracion125 1.010 0.173 Inf      1   0.058
0.9999 (pvalor x 2 = 1.9998)
## Concentracion75 / Concentracion125 0.617 0.128 Inf      1  -2.337
0.0898 (pvalor x 2 = 0.1796)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                ratio      SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  0.881 0.173 Inf      1  -0.648
0.9163 (pvalor x 2 = 1.8326)

```

```

## Concentracion0 / Concentracion75  1.068 0.199 Inf    1    0.354
0.9848 (pvalor x 2 = 1.9696)
## Concentracion0 / Concentracion125  0.987 0.192 Inf    1   -0.067
0.9999 (pvalor x 2 = 1.9998)
## Concentracion25 / Concentracion75  1.213 0.235 Inf    1    0.995
0.7524 (pvalor x 2 = 1.5048)
## Concentracion25 / Concentracion125 1.121 0.227 Inf    1    0.564
0.9427 (pvalor x 2 = 1.8854)
## Concentracion75 / Concentracion125 0.924 0.178 Inf    1   -0.409
0.9769 (pvalor x 2 = 1.9538)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
## Tests are performed on the log scale

compVRpares2 <- emmeans(m2_com, pairwise ~ Bacteria | Concentracion, type
= "response")
compVRpares2

## $emmeans
## Concentracion = 0:
## Bacteria      response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## sin inocular    4.97 0.652 Inf    3.84      6.42
## 31A6TWB2.1      3.65 0.497 Inf    2.79      4.76
## 44A7TWB1.1      4.25 0.567 Inf    3.27      5.52
##
## Concentracion = 25:
## Bacteria      response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## sin inocular    5.35 0.598 Inf    4.30      6.66
## 31A6TWB2.1      5.17 0.627 Inf    4.08      6.56
## 44A7TWB1.1      4.83 0.696 Inf    3.64      6.40
##
## Concentracion = 75:
## Bacteria      response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## sin inocular    5.96 0.711 Inf    4.72      7.53
## 31A6TWB2.1      3.16 0.530 Inf    2.27      4.39
## 44A7TWB1.1      3.98 0.518 Inf    3.08      5.13
##
## Concentracion = 125:
## Bacteria      response      SE  df asymp.LCL asymp.UCL
## sin inocular    3.12 0.491 Inf    2.29      4.25
## 31A6TWB2.1      5.12 0.620 Inf    4.04      6.49
## 44A7TWB1.1      4.31 0.612 Inf    3.26      5.69
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
##
## $contrasts
## Concentracion = 0:
## contrast          ratio      SE  df null z.ratio p.value
## sin inocular / 31A6TWB2.1 1.362 0.257 Inf    1   1.634  0.2313
(pvalor x 2 = 0.4626)
## sin inocular / 44A7TWB1.1 1.169 0.219 Inf    1   0.834  0.6818

```

```

(pvalor x 2 = 1.3636)
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1 0.858 0.164 Inf 1 -0.801 0.7025
(pvalor x 2 = 1.4050)
##
## Concentracion = 25:
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## sin inocular / 31A6TWB2.1 1.035 0.171 Inf 1 0.210 0.9760
(pvalor x 2 = 1.9520)
## sin inocular / 44A7TWB1.1 1.109 0.202 Inf 1 0.568 0.8369
(pvalor x 2 = 1.6738)
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1 1.072 0.202 Inf 1 0.367 0.9285
(pvalor x 2 = 1.8570)
##
## Concentracion = 75:
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## sin inocular / 31A6TWB2.1 1.889 0.389 Inf 1 3.088 0.0057
(pvalor x 2 = 0.0114)

## sin inocular / 44A7TWB1.1 1.499 0.264 Inf 1 2.296 0.0564
(pvalor x 2 = 0.1128)
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1 0.794 0.169 Inf 1 -1.088 0.5212
(pvalor x 2 = 1.0424)
##
## Concentracion = 125:
## contrast ratio SE df null z.ratio p.value
## sin inocular / 31A6TWB2.1 0.610 0.121 Inf 1 -2.492 0.0339
(pvalor x 2 = 0.0678)
## sin inocular / 44A7TWB1.1 0.725 0.154 Inf 1 -1.515 0.2838
(pvalor x 2 = 0.5676)

## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1 1.189 0.222 Inf 1 0.928 0.6223
(pvalor x 2 = 1.2446)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
## Tests are performed on the log scale

```

Tablas A7. Número de hojas de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
lubridate,
#nasapower,
janitor,
tidyverse,
skimr,
#see,
#GGally,
#correlation,
ggcorrplot,
viridis,
performance,
ggeffects,
emmeans,
multcomp,
glmmTMB,
MASS,
lme4,
multcompView,
DHARMa,#para GLMM-inflados en ceros
texreg,
DescTools,
agricolae,
TH.data,
mvtnorm,
survival,
lsmeans,
dplyr,
cars
)

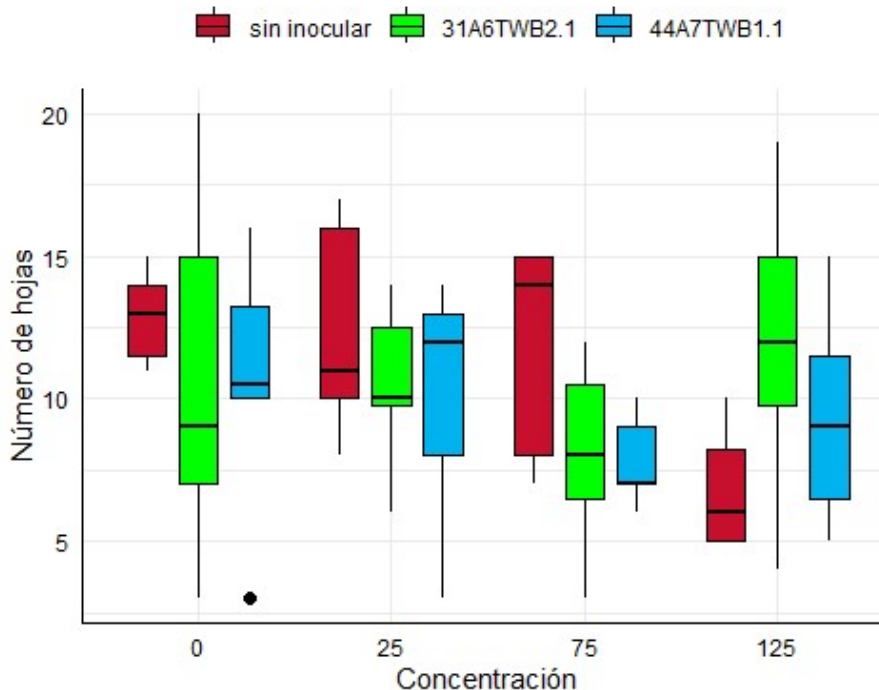
## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
plantas <- read_excel("Numerohojas.xlsx")
library(dplyr)
plantas <- plantas %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
plantas$Bacteria <- factor(plantas$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
plantas$Concentracion <- as.factor(plantas$Concentracion)
plantas$Semanacovariable <- as.factor(plantas$Semanacovariable)
```

Gráficos

```
library(ggplot2)
library(ggpubr)
ggplot(plantas, aes(x = Concentracion, y = Numerohojas, fill = Bacteria))
+
  geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
              outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
              colour = "black", lwd = 0.5) +
  scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1" =
"#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
  scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1"
= "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
  labs(x = "Concentración",
       y = "Número de hojas") +
  theme_minimal() +
  theme(legend.position = "top",
        legend.title = element_blank(),
        axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
        axis.text = element_text(colour = "black"),
        axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo Poisson

```

m2 <- glm(Numerohojas ~ Concentracion * Bacteria + Semanacovariable, data
= plantas, family = poisson)#Modelo lineal generalizado familia poisson
summary(m2)

##
## Call:
## glm(formula = Numerohojas ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable,
##      family = poisson, data = plantas)
##
## Coefficients:
##
## Estimate Std. Error z value
Pr(>|z|)
## (Intercept)          2.52742    0.11206  22.555 < 2e-
16 ***
## Concentracion25      -0.05395    0.14267  -0.378
0.705307
## Concentracion75      -0.09309    0.15266  -0.610
0.542011
## Concentracion125     -0.64109    0.17220  -3.723
0.000197 ***
## Bacteria31A6TWB2.1   -0.17569    0.14636  -1.200
0.229989
## Bacteria44A7TWB1.1   -0.16416    0.15042  -1.091
0.275126
## Semanacovariableb     0.04589    0.06526   0.703
0.481960
## Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1  0.04797    0.20584   0.233
0.815718
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1 -0.18143    0.22633  -0.802
0.422794
## Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1  0.75105    0.22440   3.347
0.000817 ***
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1 -0.01340    0.21964  -0.061
0.951351
## Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1 -0.23047    0.22113  -1.042
0.297306
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1  0.48638    0.23772   2.046
0.040751 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
##
## Null deviance: 141.96 on 92 degrees of freedom
## Residual deviance: 109.86 on 80 degrees of freedom
## AIC: 517.25
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 4

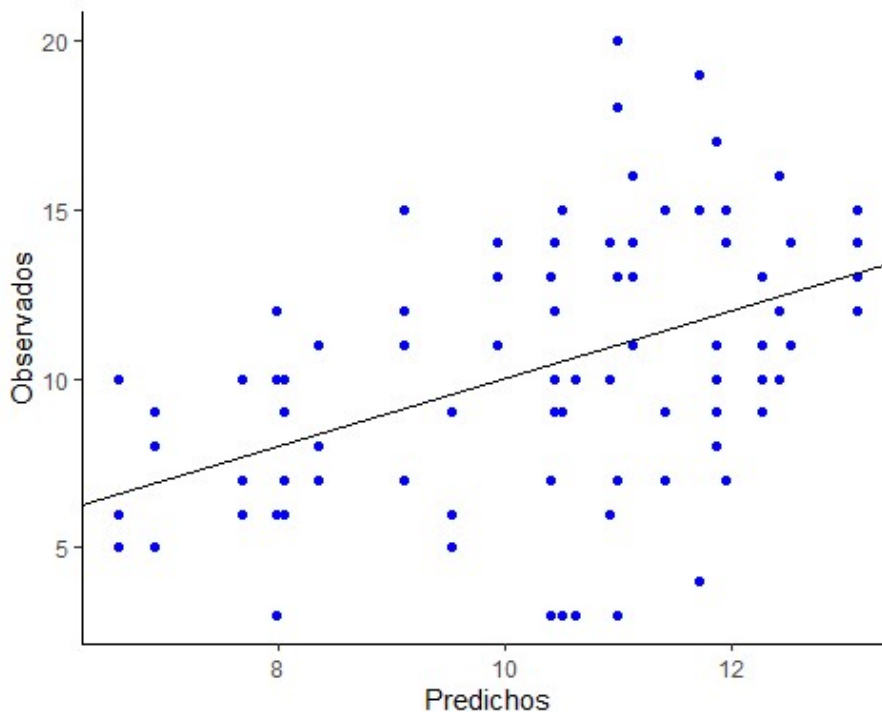
```

Chequeo de supuestos del modelo

```
dispersion <- sum(resid(m2, type = "pearson")^2) / m2$df.residual#La
varianza tiene que coincidir con la media, lambda
dispersion
```

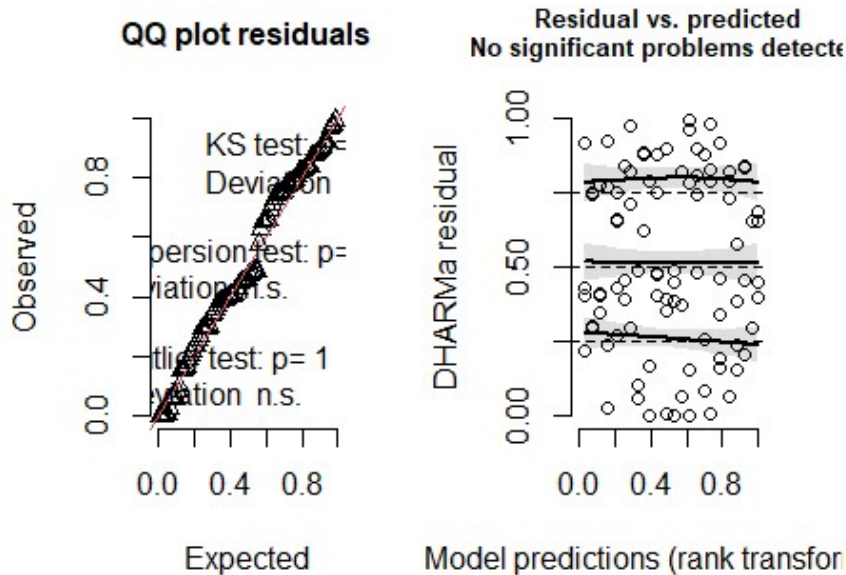
```
## [1] 1.272479
```

```
graf <- data.frame(Predichos = m2$fitted.values, Observados =
plantas$Numerohojas)
ggplot(data = graf, aes(x = Predichos, y = Observados)) +
  geom_point(colour = "blue") +
  ylab("Observados") + xlab("Predichos") +
  geom_abline(intercept = 0, slope = 1) +
  theme_classic()
```



```
sim <- simulateResiduals(m2, n = 1000)#con el dharma se da si es
significativo o no la desviacion
plot(sim)
```

DHARMa residual



Anova

`library(car)`

Loading required package: carData

##

Attaching package: 'car'

The following object is masked from 'package:DescTools':

##

Recode

The following object is masked from 'package:dplyr':

##

recode

The following object is masked from 'package:purrr':

##

some

`Anova(m2)`

Analysis of Deviance Table (Type II tests)

##

Response: Numerohojas

	LR	Chisq	Df	Pr(>Chisq)
## Concentracion	8.9888	3	0.029440	*
## Bacteria	2.4641	2	0.291699	
## Semanacovariable	0.4945	1	0.481930	
## Concentracion:Bacteria	19.5887	6	0.003277	**

```
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Medias y Comparaciones entre tratamientos

```
compVR <- emmeans(m2, ~ Concentracion * Bacteria, type = "response")
compVR
```

##	Concentracion	Bacteria	rate	SE	df	asympt.LCL	asympt.UCL
##	0	sin inocular	12.81	1.352	Inf	10.42	15.76
##	25	sin inocular	12.14	1.163	Inf	10.06	14.65
##	75	sin inocular	11.67	1.291	Inf	9.40	14.50
##	125	sin inocular	6.75	0.918	Inf	5.17	8.81
##	0	31A6TWB2.1	10.75	1.092	Inf	8.81	13.12
##	25	31A6TWB2.1	10.68	1.162	Inf	8.63	13.22
##	75	31A6TWB2.1	8.17	1.082	Inf	6.30	10.59
##	125	31A6TWB2.1	12.00	1.224	Inf	9.82	14.65
##	0	44A7TWB1.1	10.87	1.166	Inf	8.81	13.41
##	25	44A7TWB1.1	10.16	1.301	Inf	7.91	13.06
##	75	44A7TWB1.1	7.87	0.934	Inf	6.23	9.93
##	125	44A7TWB1.1	9.31	1.156	Inf	7.30	11.88

```
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
```

```
compVRpares1 <- emmeans(m2, pairwise ~ Concentracion | Bacteria, type =
"response")
compVRpares1
```

```
## $emmeans
## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion rate SE df asympt.LCL asympt.UCL
## 0 12.81 1.352 Inf 10.42 15.76
## 25 12.14 1.163 Inf 10.06 14.65
## 75 11.67 1.291 Inf 9.40 14.50
## 125 6.75 0.918 Inf 5.17 8.81
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion rate SE df asympt.LCL asympt.UCL
## 0 10.75 1.092 Inf 8.81 13.12
## 25 10.68 1.162 Inf 8.63 13.22
## 75 8.17 1.082 Inf 6.30 10.59
## 125 12.00 1.224 Inf 9.82 14.65
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion rate SE df asympt.LCL asympt.UCL
## 0 10.87 1.166 Inf 8.81 13.41
## 25 10.16 1.301 Inf 7.91 13.06
## 75 7.87 0.934 Inf 6.23 9.93
## 125 9.31 1.156 Inf 7.30 11.88
##
```

```
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
```

```

##
## $contrasts
## Bacteria = sin inocular:
## contrast          ratio    SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  1.055 0.151 Inf    1  0.378
0.9816 (pvalor x 2 = 1.9632)
## Concentracion0 / Concentracion75  1.098 0.168 Inf    1  0.610
0.9290 (pvalor x 2 = 1.8580)
## Concentracion0 / Concentracion125 1.899 0.327 Inf    1  3.723
0.0011 (pvalor x 2 = 0.0022)
## Concentracion25 / Concentracion75  1.040 0.152 Inf    1  0.267
0.9933 (pvalor x 2 = 1.9866)
## Concentracion25 / Concentracion125 1.799 0.299 Inf    1  3.527
0.0024 (pvalor x 2 = 0.0048)
## Concentracion75 / Concentracion125 1.730 0.303 Inf    1  3.126
0.0096 (pvalor x 2 = 0.0192)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast          ratio    SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  1.006 0.150 Inf    1  0.040
1.0000 (pvalor x 2 = 2.0000)
## Concentracion0 / Concentracion75  1.316 0.220 Inf    1  1.643
0.3545
## Concentracion0 / Concentracion125  0.896 0.129 Inf    1 -0.764
0.8708 (pvalor x 2 = 0.7090)
## Concentracion25 / Concentracion75  1.308 0.224 Inf    1  1.568
0.3969 (pvalor x 2 = 0.7938)
## Concentracion25 / Concentracion125 0.891 0.133 Inf    1 -0.777
0.8648 (pvalor x 2 = 1.7296)
## Concentracion75 / Concentracion125 0.681 0.114 Inf    1 -2.298
0.0984 (pvalor x 2 = 0.1968)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast          ratio    SE  df null z.ratio
p.value
## Concentracion0 / Concentracion25  1.070 0.179 Inf    1  0.403
0.9778 (pvalor x 2 = 1.9556)
## Concentracion0 / Concentracion75  1.382 0.221 Inf    1  2.023
0.1796 (pvalor x 2 = 0.3592)
## Concentracion0 / Concentracion125  1.167 0.191 Inf    1  0.943
0.7815 (pvalor x 2 = 1.5630)
## Concentracion25 / Concentracion75  1.292 0.226 Inf    1  1.467
0.4574 (pvalor x 2 = 0.9148)
## Concentracion25 / Concentracion125 1.091 0.195 Inf    1  0.490
0.9614 (pvalor x 2 = 1.9228)
## Concentracion75 / Concentracion125 0.845 0.145 Inf    1 -0.982
0.7595 (pvalor x 2 = 1.5190)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates
## Tests are performed on the log scale

```

```

compVRpares2 <- emmeans(m2, pairwise ~ Bacteria | Concentracion, type =
"response")
compVRpares2

## $emmeans
## Concentracion = 0:
##   Bacteria      rate      SE   df asymp.LCL asymp.UCL
##   sin inocular 12.81 1.352 Inf     10.42    15.76
##   31A6TWB2.1  10.75 1.092 Inf     8.81     13.12
##   44A7TWB1.1  10.87 1.166 Inf     8.81     13.41
##
## Concentracion = 25:
##   Bacteria      rate      SE   df asymp.LCL asymp.UCL
##   sin inocular 12.14 1.163 Inf     10.06    14.65
##   31A6TWB2.1  10.68 1.162 Inf     8.63     13.22
##   44A7TWB1.1  10.16 1.301 Inf     7.91     13.06
##
## Concentracion = 75:
##   Bacteria      rate      SE   df asymp.LCL asymp.UCL
##   sin inocular 11.67 1.291 Inf     9.40     14.50
##   31A6TWB2.1   8.17 1.082 Inf     6.30     10.59
##   44A7TWB1.1   7.87 0.934 Inf     6.23     9.93
##
## Concentracion = 125:
##   Bacteria      rate      SE   df asymp.LCL asymp.UCL
##   sin inocular  6.75 0.918 Inf     5.17     8.81
##   31A6TWB2.1  12.00 1.224 Inf     9.82     14.65
##   44A7TWB1.1   9.31 1.156 Inf     7.30     11.88
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
## Intervals are back-transformed from the log scale
##
## $contrasts
## Concentracion = 0:
##   contrast                ratio      SE   df null z.ratio p.value
##   sin inocular / 31A6TWB2.1 1.192 0.1745 Inf    1   1.200 0.4529
##   (pvalor x 2 = 0.9058)
##   sin inocular / 44A7TWB1.1 1.178 0.1773 Inf    1   1.091 0.5194
##   (pvalor x 2 = 1.0388)
##   31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1   0.989 0.1460 Inf    1  -0.078 0.9966
##   (pvalor x 2 = 1.9932)
##
## Concentracion = 25:
##   contrast                ratio      SE   df null z.ratio p.value
##   sin inocular / 31A6TWB2.1 1.136 0.1645 Inf    1   0.882 0.6516
##   (pvalor x 2 = 1.3032)
##   sin inocular / 44A7TWB1.1 1.194 0.1910 Inf    1   1.110 0.5078
##   (pvalor x 2 = 1.0156)
##   31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1   1.051 0.1766 Inf    1   0.297 0.9526
##   (pvalor x 2 = 1.9052)
##
## Concentracion = 75:
##   contrast                ratio      SE   df null z.ratio p.value

```

```

## sin inocular / 31A6TWB2.1 1.429 0.2468 Inf    1    2.068  0.0966
(pvalor x 2 = 0.1932)
## sin inocular / 44A7TWB1.1 1.484 0.2405 Inf    1    2.434  0.0396
(pvalor x 2 = 0.0792)
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1    1.038 0.1848 Inf    1    0.211  0.9758
(pvalor x 2 = 1.9516)
##
## Concentracion = 125:
## contrast          ratio      SE  df null z.ratio p.value
## sin inocular / 31A6TWB2.1 0.562 0.0957 Inf    1   -3.382  0.0021
(pvalor x 2 = 0.0042)
## sin inocular / 44A7TWB1.1 0.725 0.1335 Inf    1   -1.749  0.1870
(pvalor x 2 = 0.3740)
## 31A6TWB2.1 / 44A7TWB1.1    1.288 0.2070 Inf    1    1.575  0.2563
(pvalor x 2 = 0.5126)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates
## Tests are performed on the log scale

```

Tablas A8. Longitud de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
lubridate,
#nasapower,
janitor,
tidyverse,
skimr,
#see,
#GGally,
#correlation,
ggcorrplot,
viridis,
performance,
ggeffects,
emmeans,
multcomp,
glmmTMB,
MASS,
lme4,
multcompView,
DHARMA,#para GLMM-inflados en ceros
texreg,
DescTools,
agricolae,
TH.data,
mvtnorm,
survival,
lsmeans,
dplyr,
cars
)

## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Longitudvastagointentosinvaloresraros.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
str(datos)
```

```
## tibble [89 × 4] (S3: tbl_df/tbl/data.frame)
## $ Concentracion : num [1:89] 125 125 125 125 125 125 125 125 125 125 ...
## $ Bacteria      : chr [1:89] "sin inocular" "sin inocular" "sin inocular" "sin inocular" ...
## $ Longitudvastago : num [1:89] 34.3 43.2 36.5 41.3 35.9 35.3 30.9 58.9 41.5 42.8 ...
## $ Semanacovariable: chr [1:89] "a" "b" "b" "a" ...

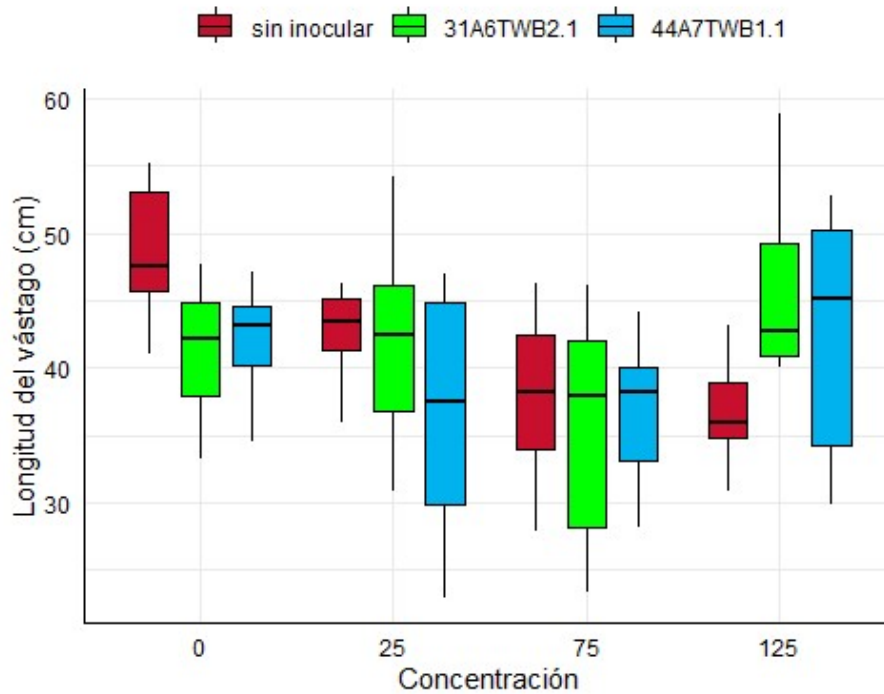
class(datos$Concentracion)#para revisar el tipo de dato

## [1] "numeric"

datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de dato
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular", "31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
library(ggpubr)
ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Longitudvastago, fill = Bacteria)) +
  geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
              outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color = Bacteria),
              colour = "black", lwd = 0.5) +
  scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
  scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
  labs(x = "Concentración",
       y = "Longitud del vástago (cm)") +
  theme_minimal() +
  theme(legend.position = "top",
        legend.title = element_blank(),
        axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
        axis.text = element_text(colour = "black"),
        axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```

modelo<-
lm(Longitudvastago~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:
Bacteria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Longitudvastago ~ Concentracion + Bacteria +
##     Semanacovariable +
##     Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25              49.0882
##              6.3190
##              Concentracion75
Concentracion125             -10.5603
##              12.0143
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1             -7.2728
##              6.5843
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.7058
##              7.1807
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1

```

```

Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##                                4.4617
16.6022
##  Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##                                0.7680
5.4152
##  Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##                                12.2272

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.98487, p-value = 0.391

library(car)

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

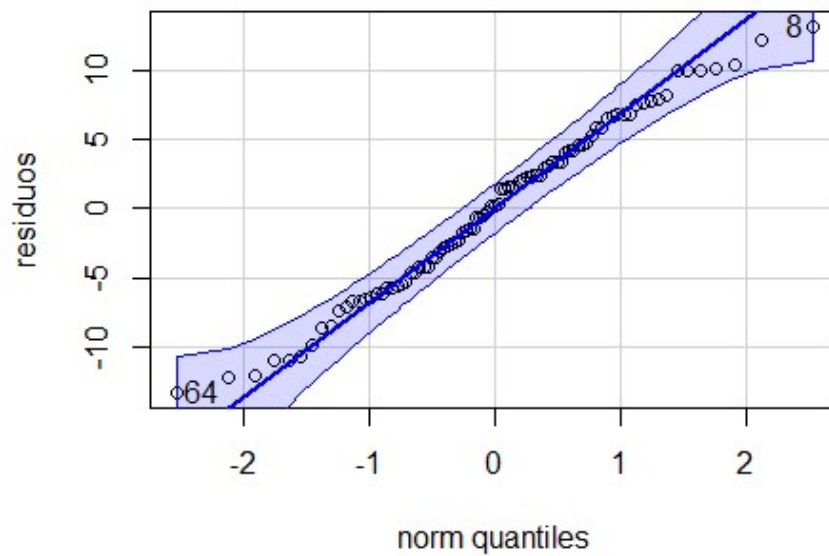
## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##      Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      recode

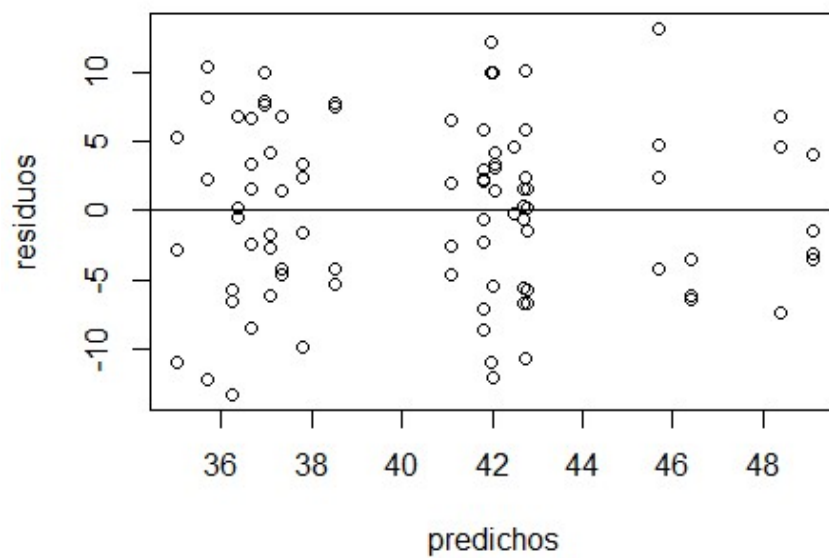
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

qqPlot(residuos)

```



```
## [1] 64 8
plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Longitudvastago~Concentracion*Bacteria, data=datos, center =
mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value  Pr(>F)
## group 11  2.9677 0.002493 **
##      77
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(performance)
check_homogeneity(modelo)

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.199).
```

Modelado de varianza

```
library(nlme)

##
## Attaching package: 'nlme'

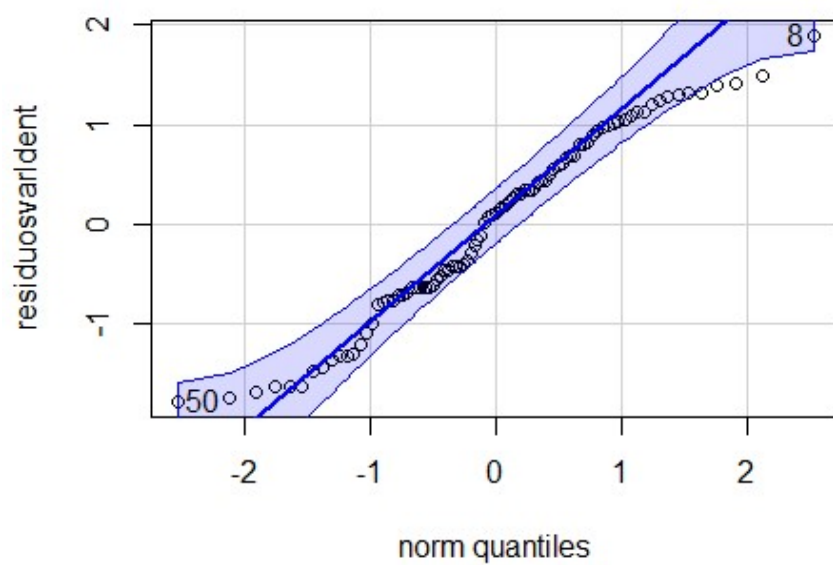
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      collapse

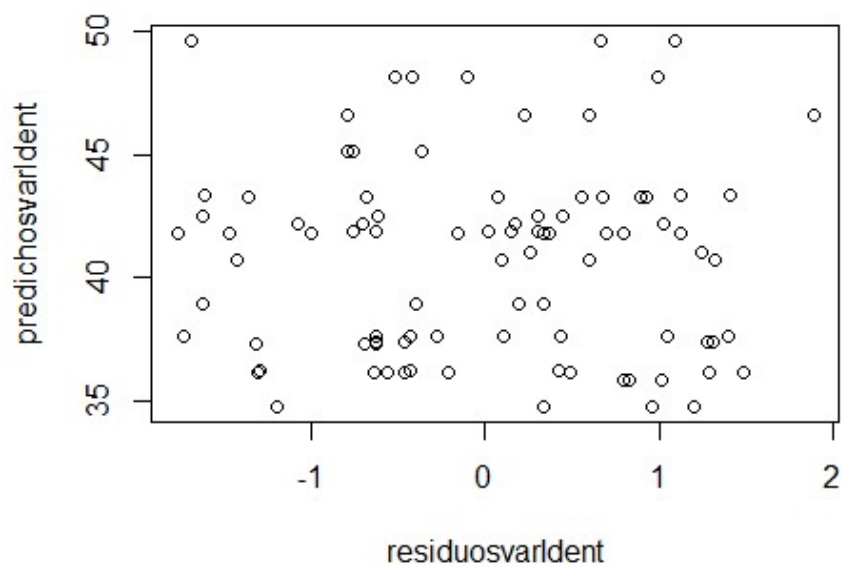
modelo_Varident <- gls(Longitudvastago ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1 |
  Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent<-resid(modelo_Varident, type = "pearson")
predichosvarIdent<-fitted(modelo_Varident)
shapiro.test(residuosvarIdent)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent
## W = 0.96722, p-value = 0.0238

library(car)
qqPlot(residuosvarIdent)
```



```
## [1] 8 50
plot(residuosvarIdent, predichosvarIdent)
abline(0,0)
```



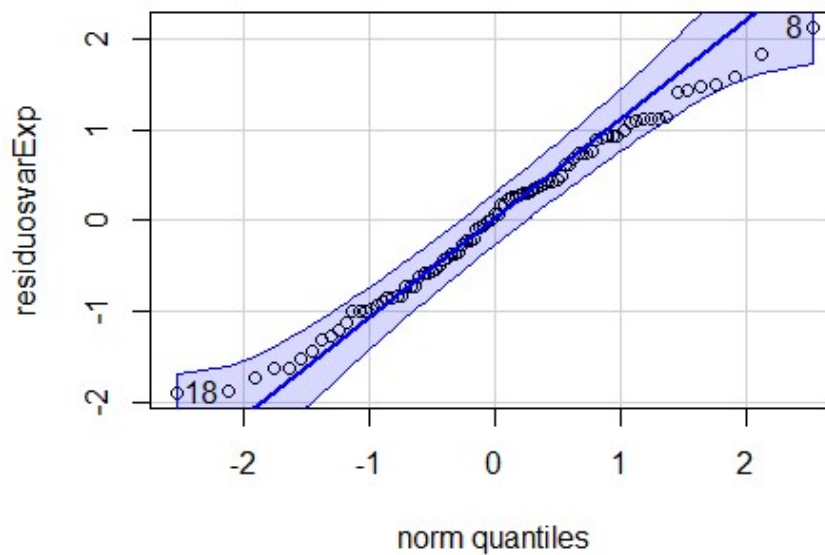
```
library(performance)
check_homogeneity(modelo_Varident)
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups  
(Bartlett Test, p = 0.199).
```

```
modelo_VarExp <- gls( Longitudvastago ~ Concentracion * Bacteria +  
Semanacovariable, data = datos, weights = varExp(form=~fitted(.)))  
residuosvarExp<-resid(modelo_VarExp, type = "pearson")  
predichosvarExp<-fitted(modelo_VarExp)  
shapiro.test(residuosvarExp)
```

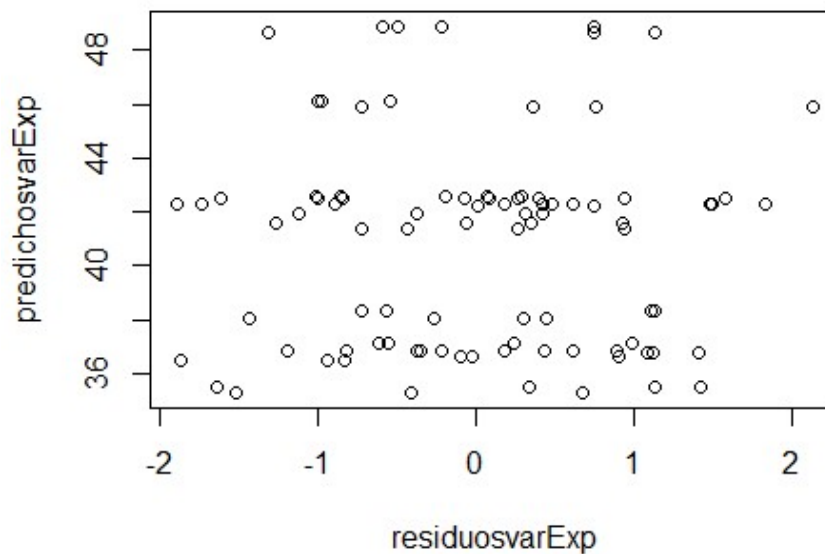
```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data:  residuosvarExp  
## W = 0.98649, p-value = 0.4891
```

```
library(car)  
qqPlot(residuosvarExp)
```



```
## [1] 8 18
```

```
plot(residuosvarExp,predichosvarExp)  
abline(0,0)
```



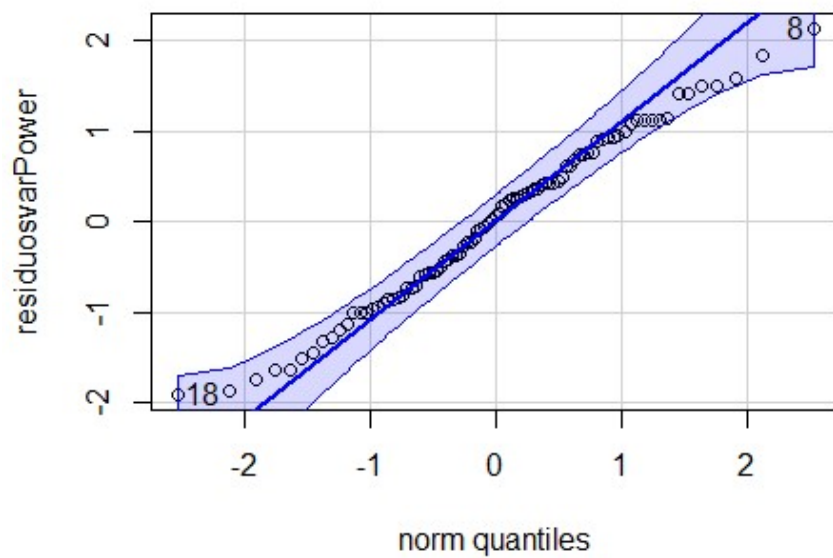
```
library(performance)
check_homogeneity(modelo_VarExp)

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.199).

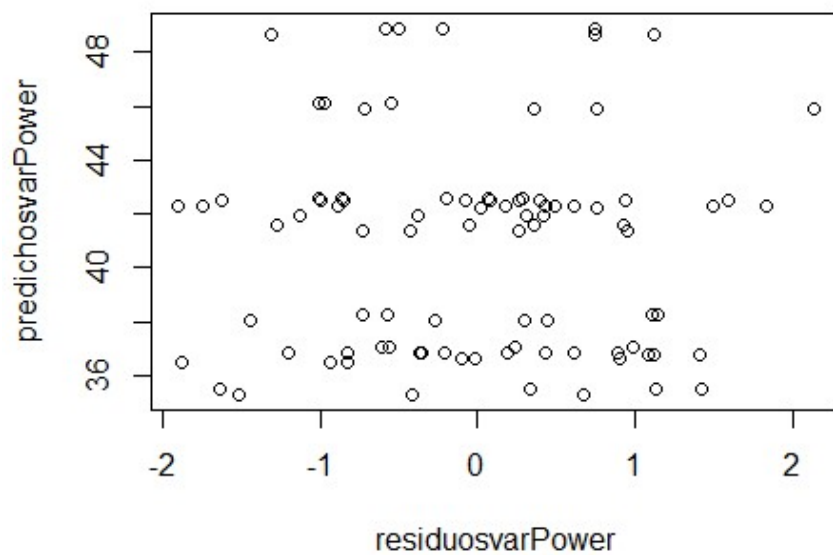
modelo_varPower <- gls( Longitudvastago ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable, data = datos, weights = varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower<-resid(modelo_varPower, type = "pearson")
predichosvarPower<-fitted(modelo_varPower)
shapiro.test(residuosvarPower)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower
## W = 0.98666, p-value = 0.5005

library(car)
qqPlot(residuosvarPower)
```



```
## [1] 8 18
plot(residuosvarPower, predichosvarPower)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelo_varPower)
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups  
(Bartlett Test, p = 0.199).
```

```
AIC(modelo_Varident, modelo_VarExp, modelo_varPower)
```

```
##           df      AIC  
## modelo_Varident 25 566.6840  
## modelo_VarExp   15 562.0457  
## modelo_varPower 15 562.0324
```

ANOVA

```
Anova(modelo_varPower)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)  
##  
## Response: Longitudvastago  
##           Df    Chisq Pr(>Chisq)  
## Concentracion      3 13.6965  0.003349 **  
## Bacteria            2  1.7623  0.414298  
## Semanacovariable    1  0.0249  0.874500  
## Concentracion:Bacteria 6 14.7007  0.022716 *  
## ---  
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Medias y Comparaciones entre tratamientos

```
library(emmeans)  
Tukey<-emmeans(modelo_varPower, pairwise ~ Bacteria | Concentracion,  
mode="df.error")  
Tukey
```

```
## $emmeans  
## Concentracion = 0:  
##   Bacteria    emmean    SE df lower.CL upper.CL  
## sin inocular 48.8 2.20 75    44.4    53.2  
## 31A6TWB2.1   41.5 2.33 75    36.8    46.1  
## 44A7TWB1.1   42.1 2.68 75    36.7    47.4  
##  
## Concentracion = 25:  
##   Bacteria    emmean    SE df lower.CL upper.CL  
## sin inocular 42.4 2.16 75    38.1    46.7  
## 31A6TWB2.1   42.4 2.30 75    37.8    47.0  
## 44A7TWB1.1   36.6 2.96 75    30.7    42.5  
##  
## Concentracion = 75:  
##   Bacteria    emmean    SE df lower.CL upper.CL  
## sin inocular 38.2 2.49 75    33.2    43.1  
## 31A6TWB2.1   35.4 2.82 75    29.8    41.0  
## 44A7TWB1.1   37.0 2.40 75    32.2    41.8  
##  
## Concentracion = 125:  
##   Bacteria    emmean    SE df lower.CL upper.CL  
## sin inocular 36.7 2.74 75    31.3    42.2  
## 31A6TWB2.1   46.0 2.31 75    41.4    50.6
```

```

## 44A7TWB1.1      42.4 2.45 75      37.5      47.3
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Degrees-of-freedom method: df.error
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## Concentracion = 0:
## contrast          estimate    SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1    7.3041 3.21 75    2.276  0.0655
(pvalor x 2 = 0.131)
## sin inocular - 44A7TWB1.1    6.6882 3.47 75    1.925  0.1386
(pvalor x 2 = 0.2772)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1   -0.6158 3.55 75   -0.173  0.9836
(pvalor x 2 = 1.9672)
##
## Concentracion = 25:
## contrast          estimate    SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1    0.0592 3.15 75    0.019  0.9998
(pvalor x 2 = 1.9996)
## sin inocular - 44A7TWB1.1    5.7911 3.67 75    1.579  0.2612
(pvalor x 2 = 0.5224)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    5.7318 3.75 75    1.528  0.2838
(pvalor x 2 = 0.5676)
##
## Concentracion = 75:
## contrast          estimate    SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1    2.7714 3.76 75    0.737  0.7421
(pvalor x 2 = 1.4842)
## sin inocular - 44A7TWB1.1    1.2030 3.46 75    0.348  0.9356
(pvalor x 2 = 1.8712)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1   -1.5684 3.71 75   -0.423  0.9062
(pvalor x 2 = 1.8124)
##
## Concentracion = 125:
## contrast          estimate    SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1   -9.2519 3.58 75   -2.582  0.0312
(pvalor x 2 = 0.0624)
## sin inocular - 44A7TWB1.1   -5.6605 3.67 75   -1.541  0.2779
(pvalor x 2 = 0.5558)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    3.5914 3.37 75    1.066  0.5382
(pvalor x 2 = 1.0764)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Degrees-of-freedom method: df.error
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

Tukey2<-emmeans(modelo_varPower, pairwise ~ Concentracion | Bacteria,
mode="df.error")
Tukey2

## $emmeans
## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean    SE df lower.CL upper.CL

```

```

## 0          48.8 2.20 75      44.4      53.2
## 25          42.4 2.16 75      38.1      46.7
## 75          38.2 2.49 75      33.2      43.1
## 125         36.7 2.74 75      31.3      42.2
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0          41.5 2.33 75      36.8      46.1
## 25          42.4 2.30 75      37.8      47.0
## 75          35.4 2.82 75      29.8      41.0
## 125         46.0 2.31 75      41.4      50.6
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0          42.1 2.68 75      36.7      47.4
## 25          36.6 2.96 75      30.7      42.5
## 75          37.0 2.40 75      32.2      41.8
## 125         42.4 2.45 75      37.5      47.3
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Degrees-of-freedom method: df.error
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 6.333 3.08 75 2.053 0.1781
## (pvalor x 2 = 0.3562)
## Concentracion0 - Concentracion75 10.584 3.32 75 3.186 0.0111
## (pvalor x 2 = 0.0222)
## Concentracion0 - Concentracion125 12.019 3.51 75 3.422 0.0055
## (pvalor x 2 = 0.0110)
## Concentracion25 - Concentracion75 4.250 3.30 75 1.290 0.5722
## (pvalor x 2 = 1.1444)
## Concentracion25 - Concentracion125 5.685 3.49 75 1.630 0.3680
## (pvalor x 2 = 0.7360)
## Concentracion75 - Concentracion125 1.435 3.70 75 0.388 0.9800
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 -0.911 3.28 75 -0.278 0.9924
## (pvalor x 2 = 1.9848)
## Concentracion0 - Concentracion75 6.051 3.66 75 1.654 0.3553
## (pvalor x 2 = 0.7106)
## Concentracion0 - Concentracion125 -4.537 3.28 75 -1.383 0.5138
## (pvalor x 2 = 1.0276)
## Concentracion25 - Concentracion75 6.962 3.63 75 1.917 0.2299
## (pvalor x 2 = 0.4598)
## Concentracion25 - Concentracion125 -3.626 3.26 75 -1.111 0.6838
## (pvalor x 2 = 1.3676)
## Concentracion75 - Concentracion125 -10.588 3.64 75 -2.906 0.0243
## (pvalor x 2 = 0.0486)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:

```

```

## contrast      estimate    SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25      5.436 3.99 75   1.361  0.5274
(pvalor x 2 = 1.0548)
## Concentracion0 - Concentracion75      5.098 3.59 75   1.419  0.4916
(pvalor x 2 = 0.9832)
## Concentracion0 - Concentracion125    -0.330 3.64 75  -0.091  0.9997
(pvalor x 2 = 1.9994)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.338 3.82 75  -0.089  0.9997
(pvalor x 2 = 1.9994)
## Concentracion25 - Concentracion125   -5.766 3.85 75  -1.499  0.4433
(pvalor x 2 = 0.8866)
## Concentracion75 - Concentracion125   -5.428 3.44 75  -1.579  0.3966
(pvalor x 2 = 0.7932)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Degrees-of-freedom method: df.error
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```

Tablas A9. Peso fresco de la raíz de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMA, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

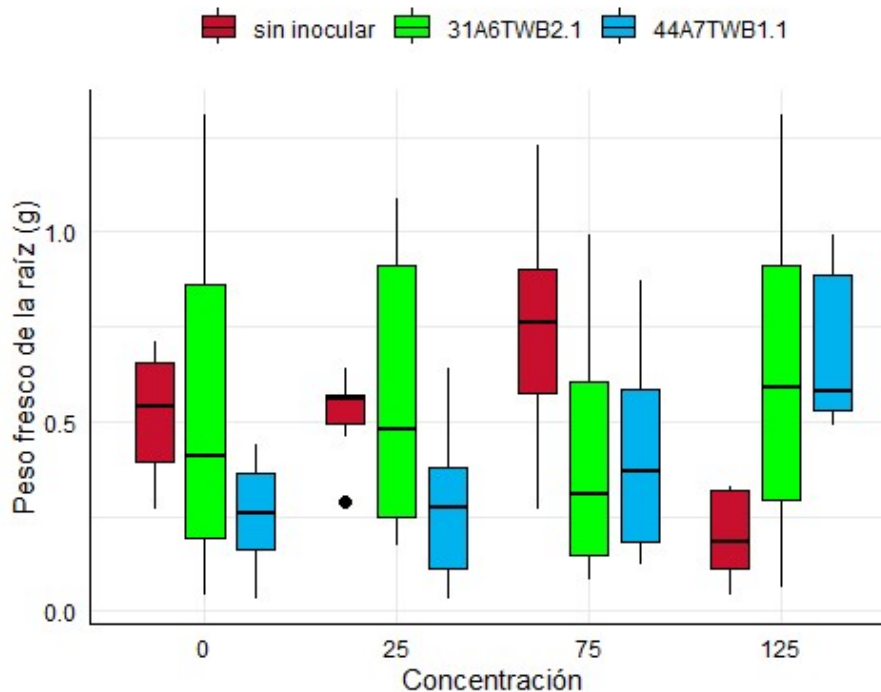
setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesofrescoraiz.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de
dato
```

Gráfico

```
library(ggplot2)
library(ggpubr)

ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = pesofrescoraiz, fill =
Bacteria)) +
geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
colour = "black", lwd = 0.5) +
scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
labs(x = "Concentración",
y = "Peso fresco de la raíz (g)") +
theme_minimal() +
theme(legend.position = "top",
legend.title = element_blank(),
axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
axis.text = element_text(colour = "black"),
axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```

modelo<-
lm(pesofrescoraiz~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:B
acteria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = pesofrescoraiz ~ Concentracion + Bacteria +
Semanacovariable +
##      Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25
##              0.586850      -
0.017427
##              Concentracion75
Concentracion125
##              0.241142      -
0.327106
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1
##              0.008699      -
0.268356
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.121988
0.032623
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.372981
0.419218
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.041593      -
0.077071
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.759464

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Prueba de supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.98552, p-value = 0.4533

library(car)

## Loading required package: carData

```

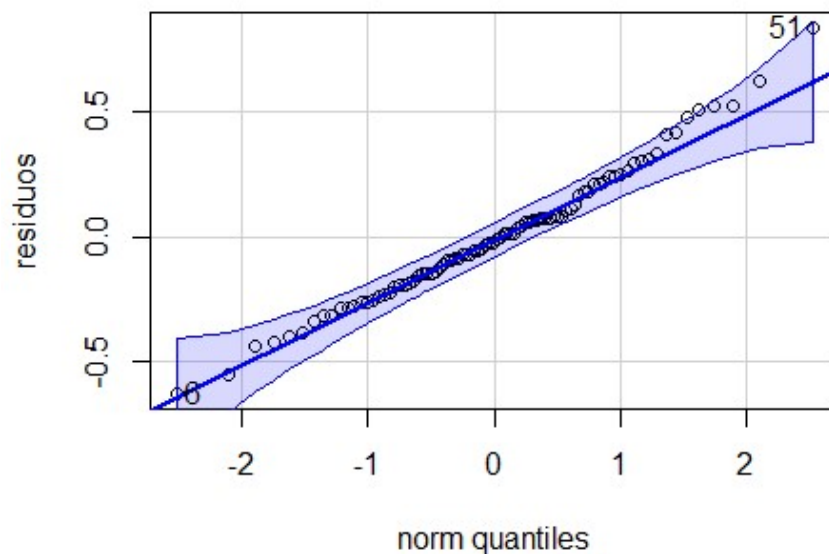
```
##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##   Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##   recode

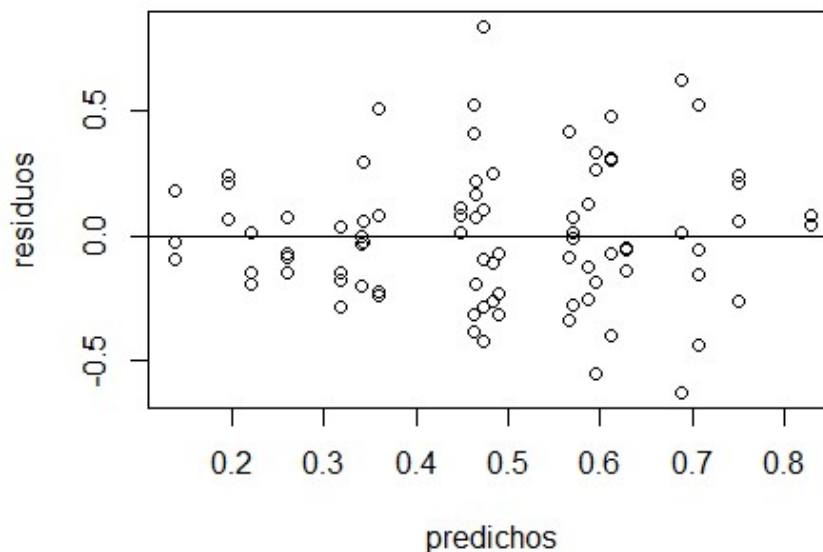
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##   some

qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 51 6

plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(pesofrescoraiz~Concentracion*Bacteria, data=datos, center =
mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value    Pr(>F)
## group 11  3.4664 0.0006258 ***
##      74
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Modelado de la varianza

```
install.packages("nlme")
```

```
## Installing package into 'C:/Users/ailel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

## package 'nlme' successfully unpacked and MD5 sums checked
##
## The downloaded binary packages are in
## C:\Users\ail\l\AppData\Local\Temp\RtmpeIysv6\downloaded_packages
```

```
library(nlme)
```

```
##
## Attaching package: 'nlme'

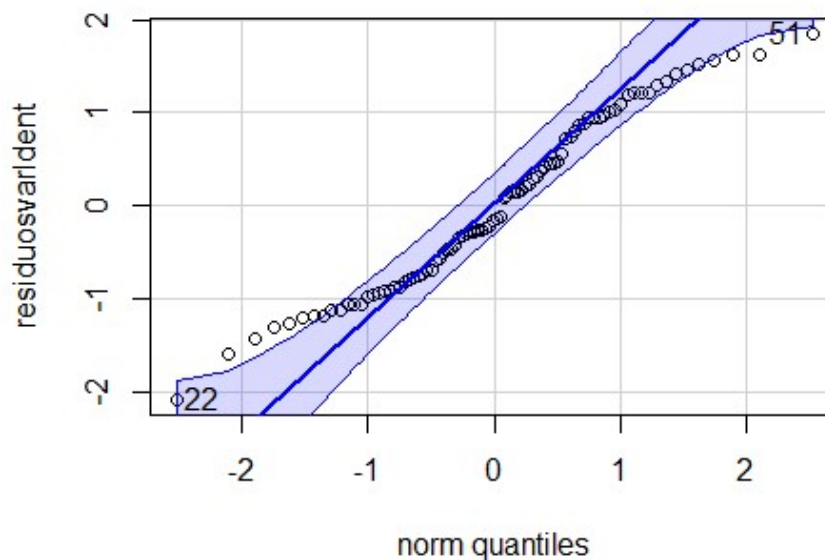
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList
```

```
## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
## collapse

modelo_Varident <- gls(pesofrescoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1 |
  Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent<-resid(modelo_Varident, type = "pearson")
predichosvarIdent<-fitted(modelo_Varident)
shapiro.test(residuosvarIdent)

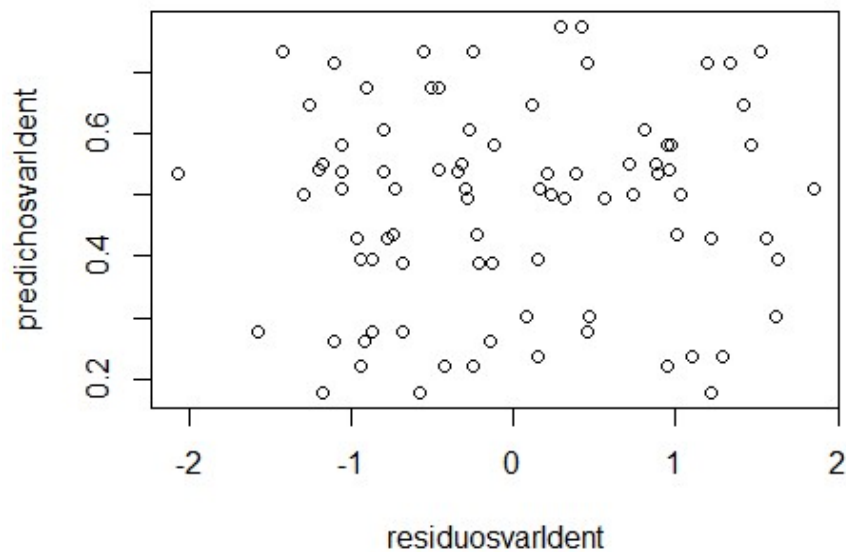
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent
## W = 0.96656, p-value = 0.02506

library(car)
qqPlot(residuosvarIdent)
```



```
## [1] 22 51

plot(residuosvarIdent,predichosvarIdent)
abline(0,0)
```



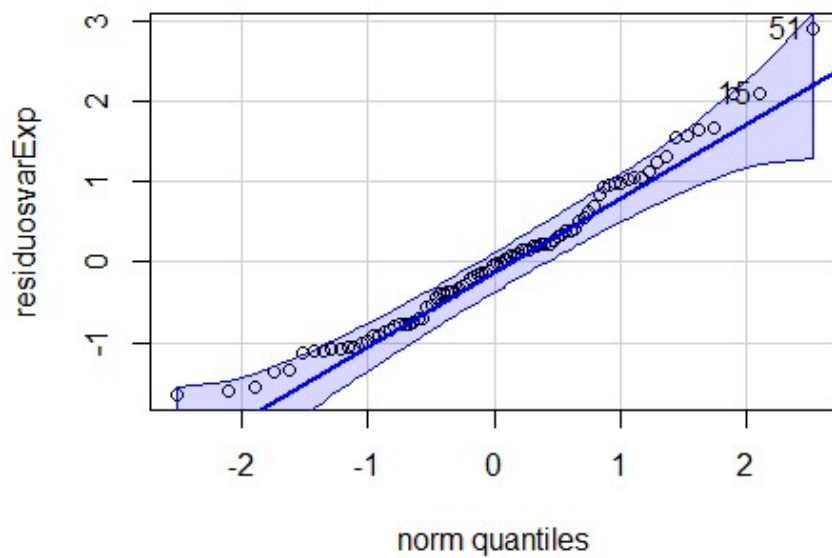
```

modelo_VarExp <- gls( pesosfrescoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp<-resid(modelo_VarExp, type = "pearson")
predichosvarExp<-fitted(modelo_VarExp)
shapiro.test(residuosvarExp)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp
## W = 0.97222, p-value = 0.06051

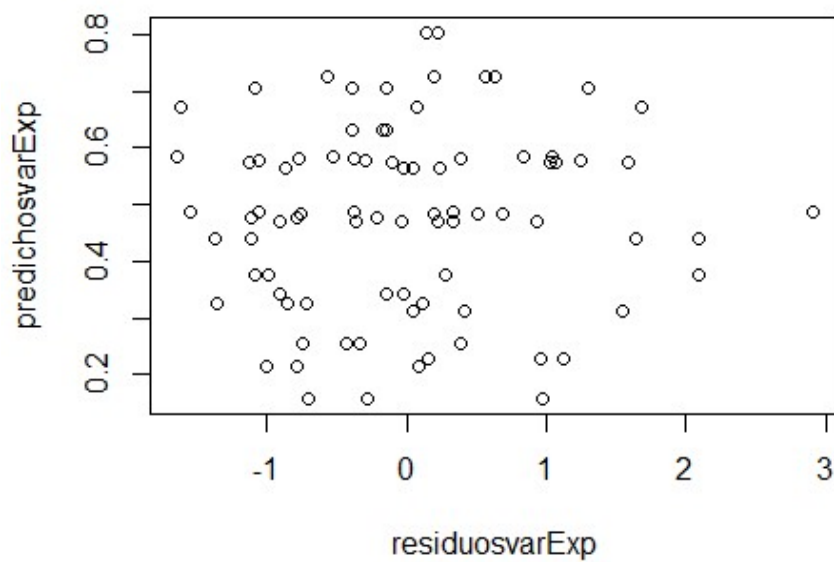
library(car)
qqPlot(residuosvarExp)

```



```
## [1] 51 15
```

```
plot(residuosvarExp, predichosvarExp)
abline(0,0)
```

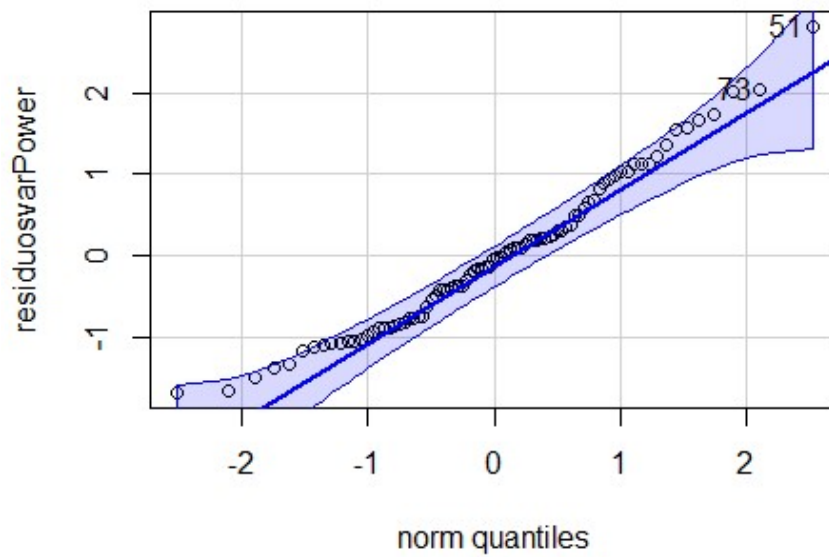


```
modelo_varPower <- gls( pesosfrescoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovvariable, data = datos, weights = varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower<-resid(modelo_varPower, type = "pearson")
```

```
predichosvarPower<-fitted(modelo_varPower)
shapiro.test(residuosvarPower)
```

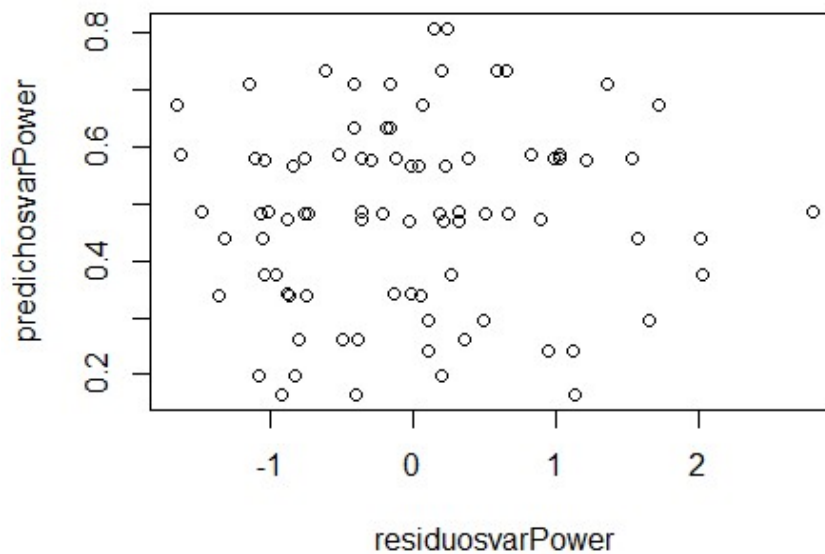
```
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower
## W = 0.97241, p-value = 0.06232
```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarPower)
```



```
## [1] 51 73
```

```
plot(residuosvarPower,predichosvarPower)
abline(0,0)
```



```
AIC(modelo_Varident, modelo_VarExp, modelo_varPower)
```

```
##              df      AIC
## modelo_Varident 25 75.89354
## modelo_VarExp   15 75.85044
## modelo_varPower 15 74.17317
```

```
leveneTest(residuosvarPower ~ Concentracion * Bacteria, data = datos,
center = mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.8172 0.06603 .
##      74
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA

```
Anova(modelo_varPower)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: pesofrescoraiz
##              Df    Chisq Pr(>Chisq)
## Concentracion    3  2.2739  0.5175387
## Bacteria          2  5.1690  0.0754330 .
## Semanacovariable  1  3.1291  0.0769065 .
## Concentracion:Bacteria  6 25.7875  0.0002439 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Medias y Comparaciones entre tratamientos

```
library(emmeans)
Tukey<-emmeans(modelo, pairwise ~ Bacteria | Concentracion,
mode="df.error")
Tukey

## $emmeans
## Concentracion = 0:
##   Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.526 0.1093 73  0.30799  0.744
## 31A6TWB2.1    0.535 0.0964 73  0.34245  0.727
## 44A7TWB1.1    0.258 0.1022 73  0.05388  0.461
##
## Concentracion = 25:
##   Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.508 0.1093 73  0.29056  0.726
## 31A6TWB2.1    0.550 0.1025 73  0.34552  0.754
## 44A7TWB1.1    0.282 0.1180 73  0.04654  0.517
##
## Concentracion = 75:
##   Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.767 0.1184 73  0.53094  1.003
## 31A6TWB2.1    0.403 0.1093 73  0.18485  0.621
## 44A7TWB1.1    0.422 0.1093 73  0.20370  0.639
##
## Concentracion = 125:
##   Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.199 0.1022 73 -0.00487  0.402
## 31A6TWB2.1    0.627 0.1180 73  0.39154  0.862
## 44A7TWB1.1    0.690 0.1093 73  0.47199  0.908
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## Concentracion = 0:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.0087 0.146 73  -0.060  0.9980
## (pvalor x 2 = 1.9960)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.2684 0.150 73   1.793  0.1789
## (pvalor x 2 = 0.3578)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.2771 0.140 73   1.972  0.1263
## (pvalor x 2 = 0.2526)
##
## Concentracion = 25:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.0413 0.150 73  -0.276  0.9588
## (pvalor x 2 = 1.9176)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.2268 0.161 73   1.410  0.3411
## (pvalor x 2 = 1.9176)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.2681 0.156 73   1.716  0.2063
## (pvalor x 2 = 0.4126)
##
```

```

## Concentracion = 75:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 0.3643 0.161 73 2.256 0.0687
(pvalor x 2 = 0.1374)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 0.3454 0.161 73 2.147 0.0875
(pvalor x 2 = 0.1750)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 -0.0189 0.155 73 -0.122 0.9918
(pvalor x 2 = 1.9836)
##
## Concentracion = 125:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.4279 0.156 73 -2.742 0.0207
(pvalor x 2 = 0.0414)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -0.4911 0.150 73 -3.282 0.0045
(pvalor x 2 = 0.0090)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 -0.0632 0.161 73 -0.393 0.9185
(pvalor x 2 = 1.8370)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

Tukey2<-emmeans(modelo, pairwise ~ Concentracion | Bacteria,
mode="df.error")
Tukey2

## $emmeans
## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.526 0.1093 73 0.30799 0.744
## 25 0.508 0.1093 73 0.29056 0.726
## 75 0.767 0.1184 73 0.53094 1.003
## 125 0.199 0.1022 73 -0.00487 0.402
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.535 0.0964 73 0.34245 0.727
## 25 0.550 0.1025 73 0.34552 0.754
## 75 0.403 0.1093 73 0.18485 0.621
## 125 0.627 0.1180 73 0.39154 0.862
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.258 0.1022 73 0.05388 0.461
## 25 0.282 0.1180 73 0.04654 0.517
## 75 0.422 0.1093 73 0.20370 0.639
## 125 0.690 0.1093 73 0.47199 0.908
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## Confidence level used: 0.95
##
## $contrasts
## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 0.0174 0.155 73 0.113 0.9995

```

```

(pvalor x 2 = 1.9990)
## Concentracion0 - Concentracion75    -0.2411 0.161 73   -1.499  0.4435
(pvalor x 2 = 0.8870)
## Concentracion0 - Concentracion125    0.3271 0.150 73    2.186  0.1368
(pvalor x 2 = 0.2736)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.2586 0.161 73   -1.601  0.3843
(pvalor x 2 = 0.7686)
## Concentracion25 - Concentracion125    0.3097 0.150 73    2.070  0.1728
(pvalor x 2 = 0.3456)
## Concentracion75 - Concentracion125    0.5682 0.156 73    3.633  0.0029
(pvalor x 2 = 0.0058)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                estimate      SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.0152 0.141 73   -0.108  0.9995
(pvalor x 2 = 1.9990)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.1318 0.146 73    0.904  0.8028
(pvalor x 2 = 1.6056)
## Concentracion0 - Concentracion125    -0.0921 0.152 73   -0.605  0.9303
(pvalor x 2 = 1.8606)
## Concentracion25 - Concentracion75     0.1470 0.150 73    0.983  0.7596
(pvalor x 2 = 1.5192)
## Concentracion25 - Concentracion125   -0.0769 0.156 73   -0.492  0.9606
(pvalor x 2 = 1.9212)
## Concentracion75 - Concentracion125   -0.2240 0.161 73   -1.392  0.5081
(pvalor x 2 = 1.0162)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                estimate      SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.0242 0.156 73   -0.155  0.9987
(pvalor x 2 = 1.9974)
## Concentracion0 - Concentracion75    -0.1641 0.150 73   -1.097  0.6928
(pvalor x 2 = 1.3856)
## Concentracion0 - Concentracion125   -0.4324 0.150 73   -2.890  0.0256
(pvalor x 2 = 0.0512)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.1399 0.161 73   -0.870  0.8204
(pvalor x 2 = 1.6408)
## Concentracion25 - Concentracion125   -0.4082 0.161 73   -2.538  0.0624
(pvalor x 2 = 0.1248)
## Concentracion75 - Concentracion125   -0.2683 0.155 73   -1.734  0.3138
(pvalor x 2 = 0.6276)
##
## Results are averaged over the levels of: Semanacovariable
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```

Tablas A10. Peso seco de la raíz de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMA, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

## Installing package into 'C:/Users/ailen/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

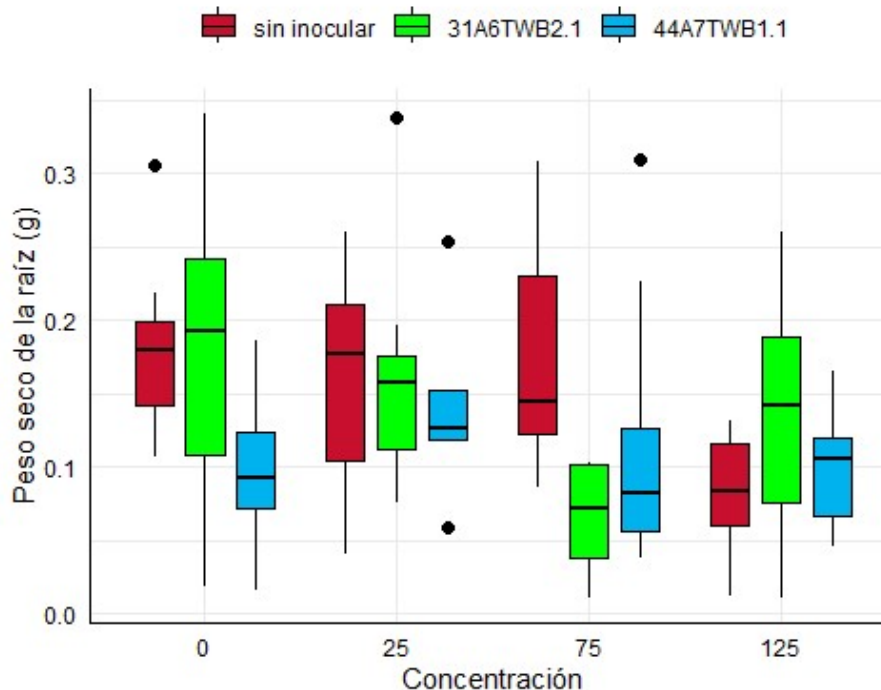
setwd("C:/Users/ailen/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesosecoraiz.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
  mutate(Bacteria = case_when(
    Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
    Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
    Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
    TRUE ~ as.character(Bacteria)
  ))
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion)
```

Gráfico

```
library("ggplot2")
library(ggpubr)

ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Pesosecoraiz, fill = Bacteria))
+
  geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
              outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
              colour = "black", lwd = 0.5) +
  scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1" =
"#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
  scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E", "31A6TWB2.1"
= "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
  labs(x = "Concentración",
       y = "Peso seco de la raíz (g)") +
  theme_minimal() +
  theme(legend.position = "top",
        legend.title = element_blank(),
        axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
        axis.text = element_text(colour = "black"),
        axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```
modelo<-
lm(Pesosecoraiz~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bac
```

```

teria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Pesosecoraiz ~ Concentracion + Bacteria +
Semanacovariable +
##      Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25
##              0.155127
0.017053
##              Concentracion75
Concentracion125
##              -0.003893
0.097082
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1
##              -0.001420
0.077201
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              0.046724
0.007987
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.103263
0.055424
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.062278
0.018770
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.097564

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Prueba de supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.98583, p-value = 0.4391

library(car)

## Loading required package: carData

```

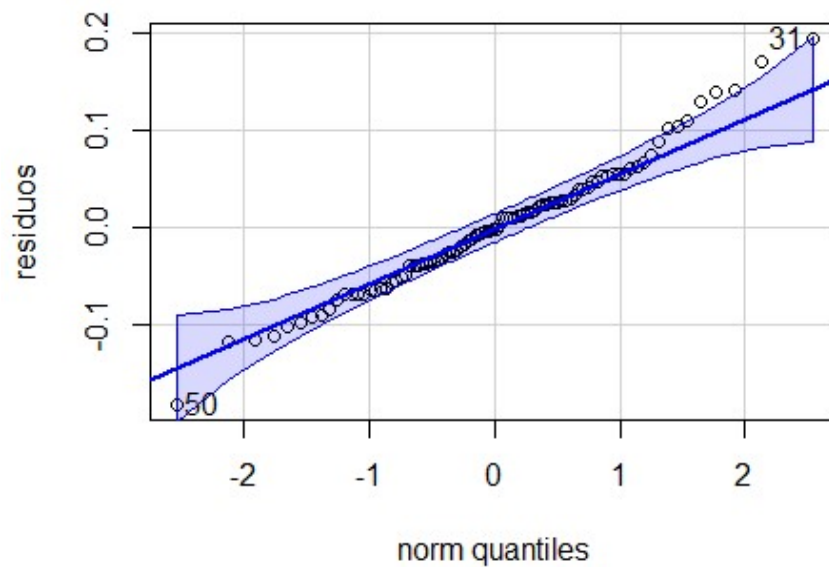
```
##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##      Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      recode

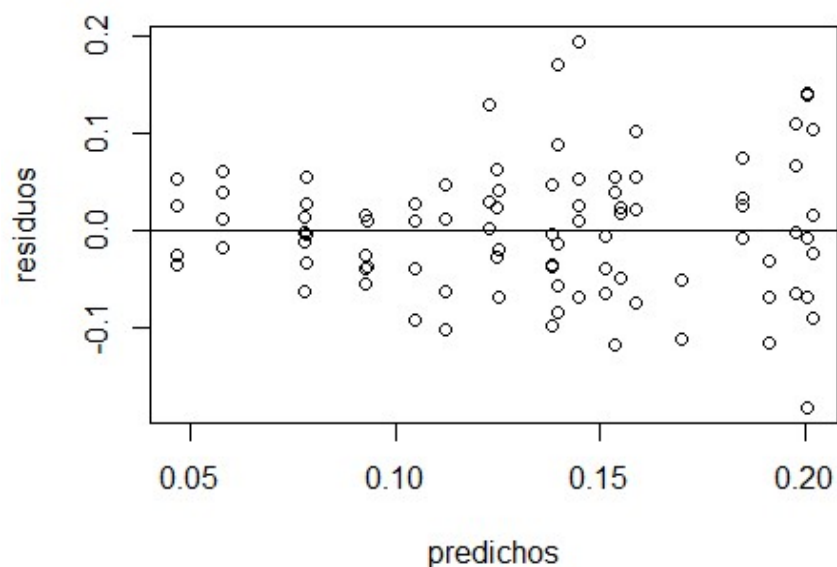
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 31 50

plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Pesosecoraiz~Concentracion*Bacteria, data=datos, center =
mean)

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.2376 0.2771
##      78

library(performance)
check_homogeneity(modelo)

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.329).
```

Modelado de la varianza

```
library(nlme)

##
## Attaching package: 'nlme'

## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      collapse

modelo_Varident <- gls(Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1 |
Concentracion * Bacteria))
```

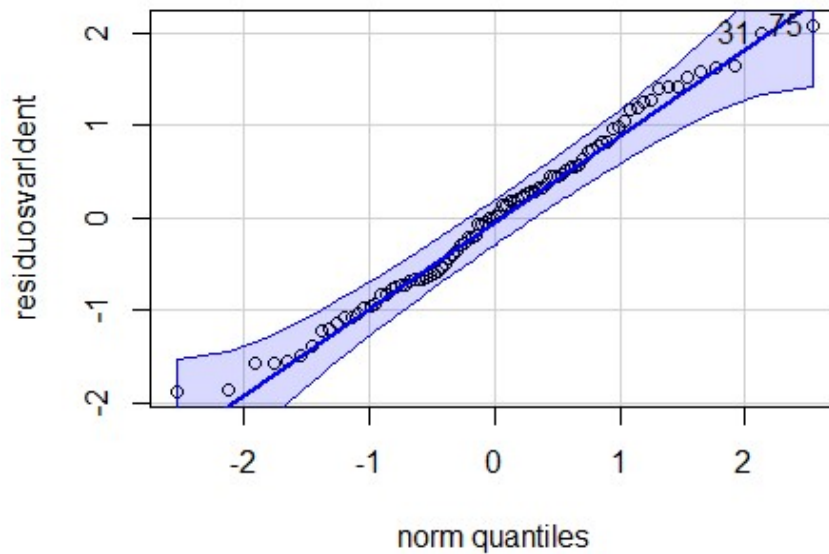
```

residuosvarIdent<-resid(modelo_Varident, type = "pearson")
predichosvarIdent<-fitted(modelo_Varident)
shapiro.test(residuosvarIdent)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent
## W = 0.9863, p-value = 0.4689

library(car)
qqPlot(residuosvarIdent)

```

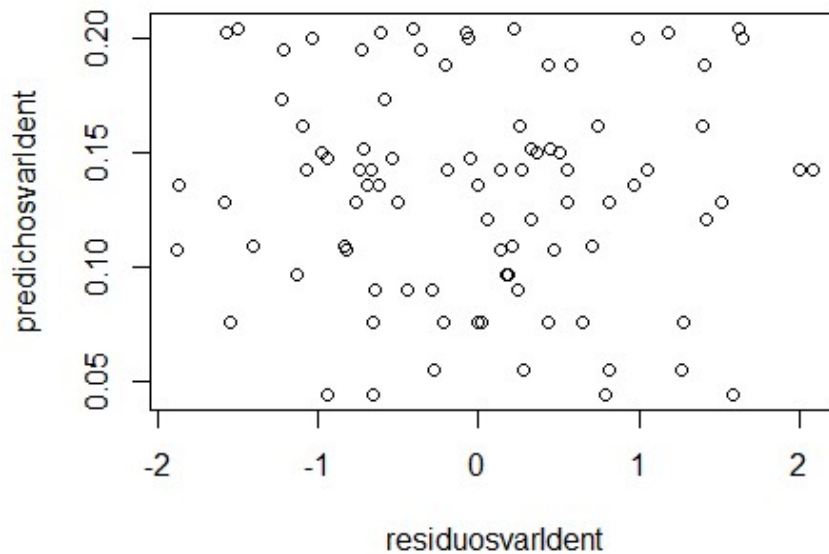


```

## [1] 75 31

plot(residuosvarIdent,predichosvarIdent)
abline(0,0)

```



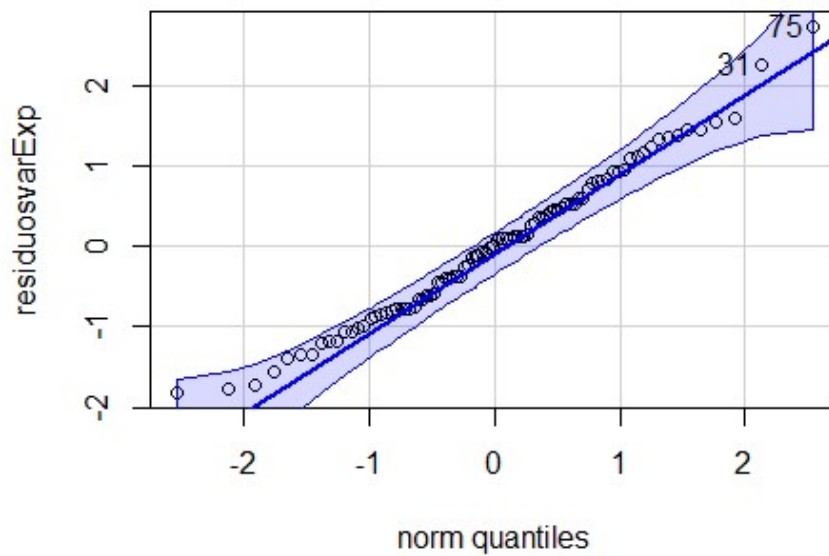
```

modelo_VarExp <- gls( Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp<-resid(modelo_VarExp, type = "pearson")
predichosvarExp<-fitted(modelo_VarExp)
shapiro.test(residuosvarExp)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp
## W = 0.98701, p-value = 0.5152

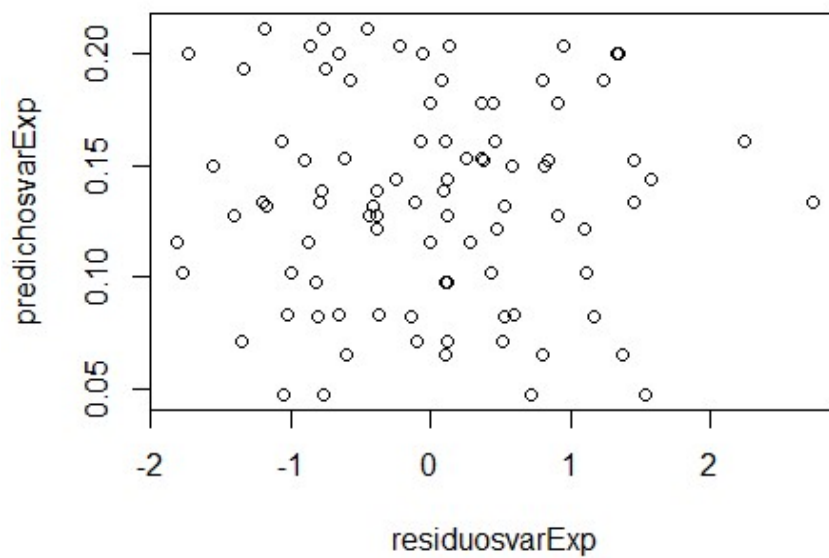
library(car)
qqPlot(residuosvarExp)

```



```
## [1] 75 31
```

```
plot(residuosvarExp, predichosvarExp)
abline(0,0)
```



```
modelo_varPower <- gls( Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovvariable, data = datos, weights = varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower<-resid(modelo_varPower, type = "pearson")
```

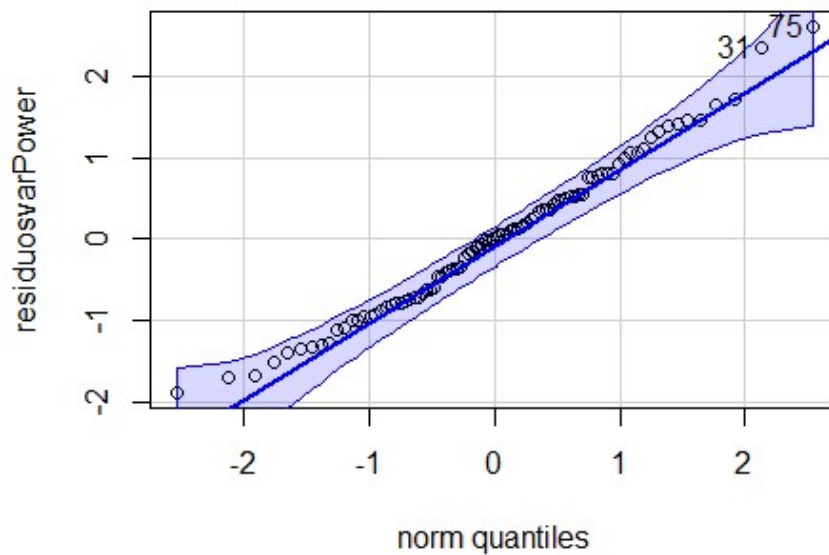
```

predichosvarPower<-fitted(modelo_varPower)
shapiro.test(residuosvarPower)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower
## W = 0.98752, p-value = 0.5502

library(car)
qqPlot(residuosvarPower)

```

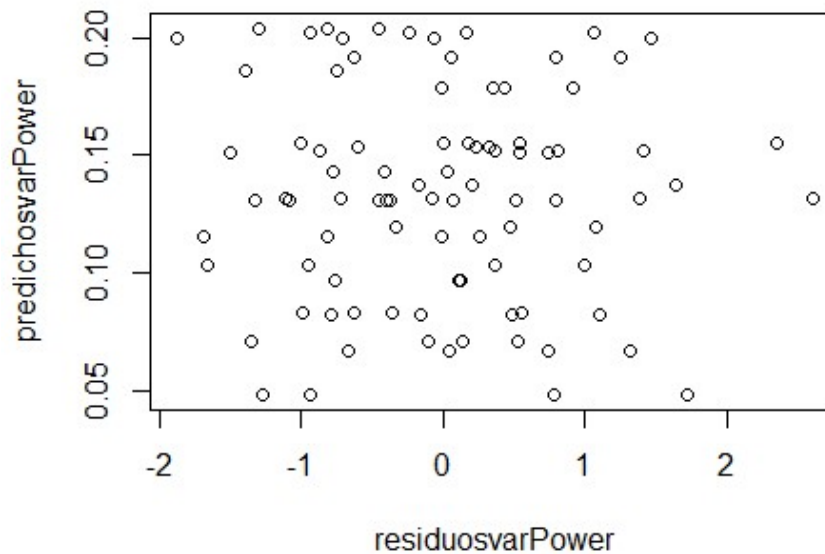


```

## [1] 75 31

plot(residuosvarPower,predichosvarPower)
abline(0,0)

```



```
AIC(modelo_Varident, modelo_VarExp, modelo_varPower)
```

```
##              df      AIC
## modelo_Varident 25 -129.6104
## modelo_VarExp   15 -144.6149
## modelo_varPower 15 -143.6936
```

```
leveneTest(residuosvarExp ~ Concentracion * Bacteria, data = datos,
center = mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  0.8942 0.5497
##      78
```

ANOVA

```
Anova(modelo_VarExp)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: Pesosecoraiz
##              Df    Chisq Pr(>Chisq)
## Concentracion   3 13.2492  0.004128 **
## Bacteria         2  0.5141  0.773316
## Semanacovariable 1 14.0928  0.000174 ***
## Concentracion:Bacteria 6 17.7787  0.006810 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Modelo nuevo con covariable

```

modelonuevocovariable<-
lm(Pesosecoraiz~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bac
teria+Concentracion:Semanacovariable +Bacteria:Semanacovariable,
data=datos)
residuos2=modelonuevocovariable$residuals
predichos2=modelonuevocovariable$fitted.values

```

Chequeo supuestos modelo nuevo con covariable

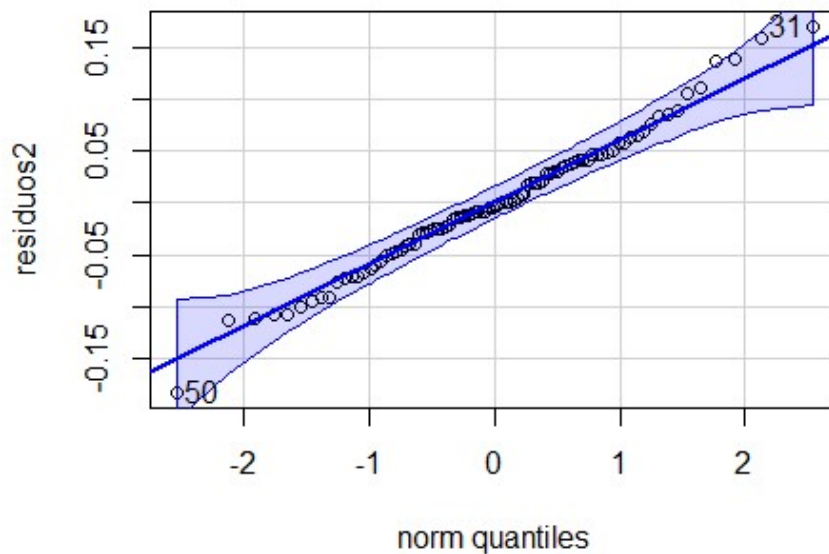
```

shapiro.test(residuos2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98991, p-value = 0.7245

library(car)
qqPlot(residuos2)

```

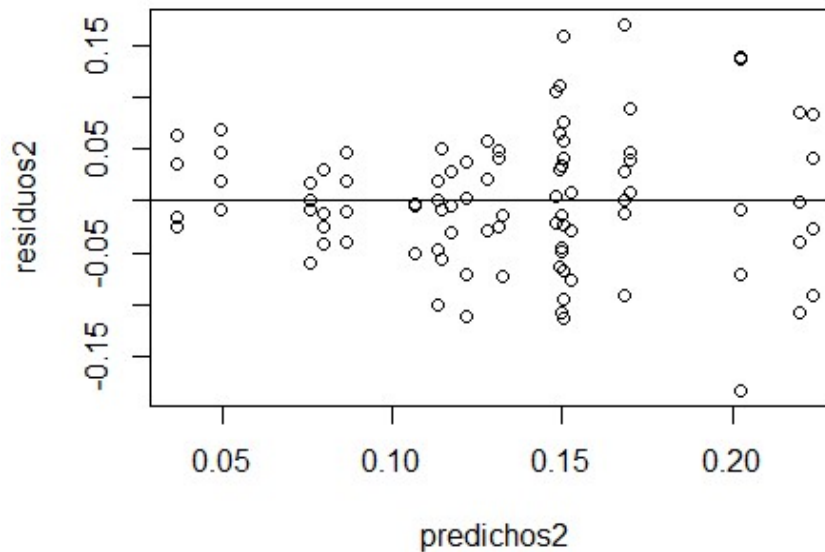


```

## [1] 50 31

plot(predichos2, residuos2)
abline(0,0)

```



```

leveneTest(Pesosecoraiz~Concentracion*Bacteria*Semanacovariable,
data=datos, center = mean)

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 23  1.8939 0.02306 *
##      66
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(performance)
check_homogeneity(modelonuevocovariable)#forma alternativa a Levene

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.329).

```

Modelado de varianza de modelo con covariable

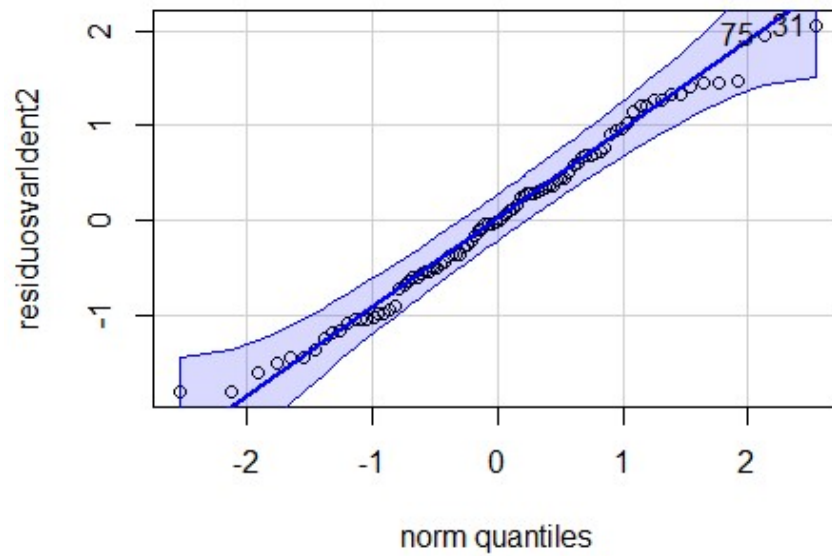
```

library(nlme)
modelo_Varident2 <- gls(Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1
| Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent2<-resid(modelo_Varident2, type = "pearson")
predichosvarIdent2<-fitted(modelo_Varident2)
shapiro.test(residuosvarIdent2)

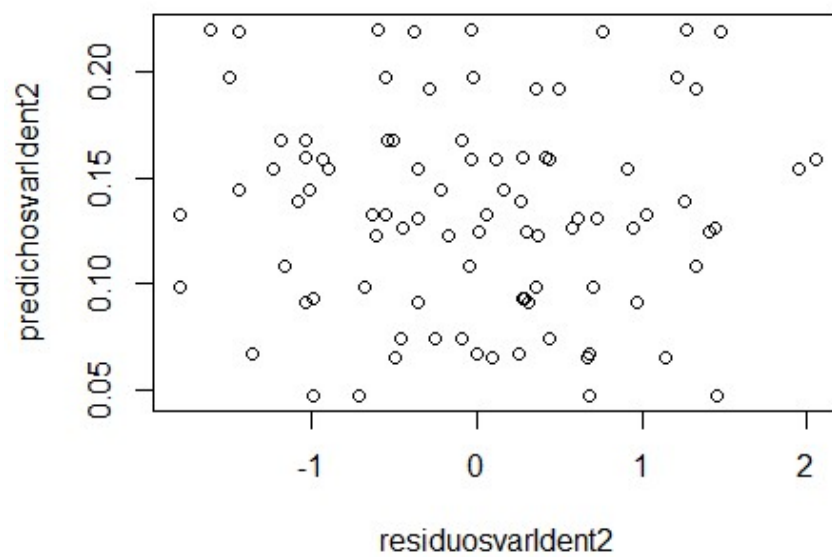
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent2
## W = 0.98642, p-value = 0.4762

```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarIdent2)
```



```
## [1] 31 75
plot(residuosvarIdent2,predichosvarIdent2)
abline(0,0)
```



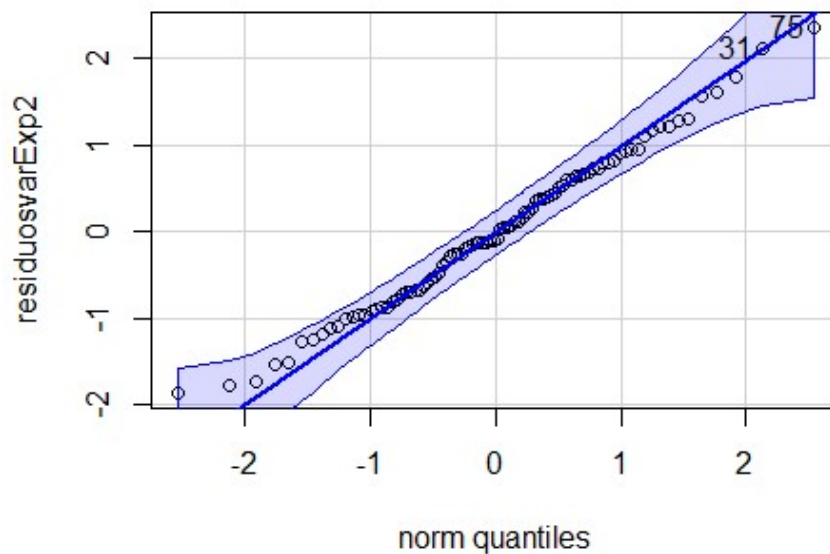
```

modelo_VarExp2 <- gls(  Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights =
varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp2<-resid(modelo_VarExp2, type = "pearson")
predichosvarExp2<-fitted(modelo_VarExp2)
shapiro.test(residuosvarExp2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp2
## W = 0.99112, p-value = 0.8099

library(car)
qqPlot(residuosvarExp2)

```

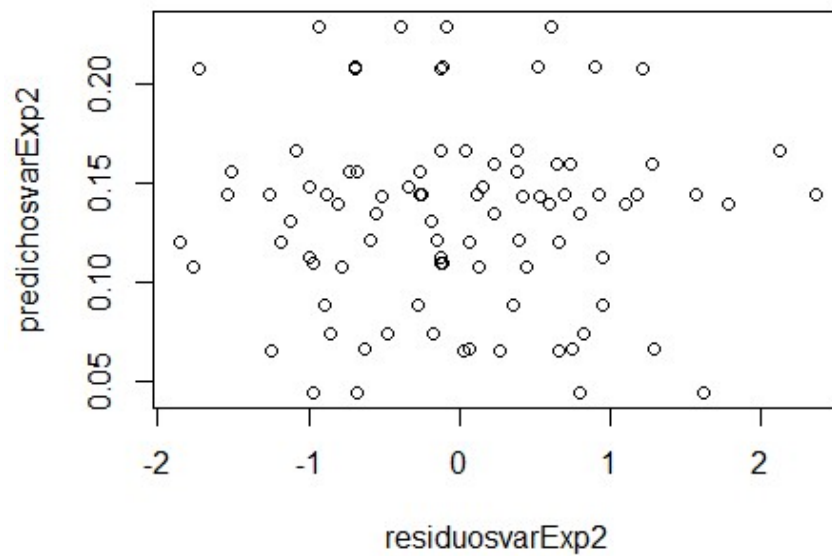


```

## [1] 75 31

plot(residuosvarExp2,predichosvarExp2)
abline(0,0)

```



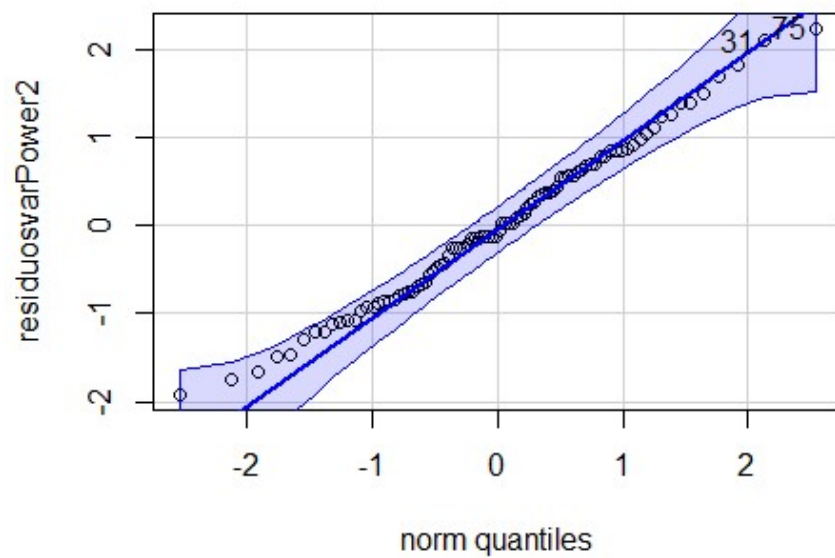
```

modelo_varPower2 <- gls( Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights =
varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower2<-resid(modelo_varPower2, type = "pearson")
predichosvarPower2<-fitted(modelo_varPower2)
shapiro.test(residuosvarPower2)

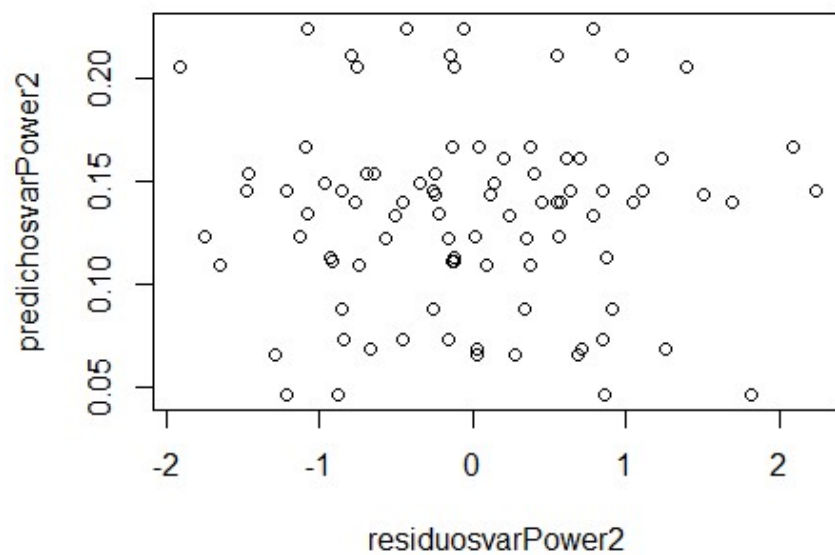
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower2
## W = 0.99113, p-value = 0.8104

library(car)
qqPlot(residuosvarPower2)

```



```
## [1] 75 31
plot(residuosvarPower2, predichosvarPower2)
abline(0,0)
```



```
AIC(modelo_Varident2, modelo_VarExp2, modelo_varPower2)
```

```
##           df      AIC
## modelo_Varident2 30 -97.98883
## modelo_VarExp2   20 -114.80894
## modelo_varPower2 20 -114.61322
```

Anova nuevo modelo con covariable y varianza modelada

```
anova(modelo_VarExp2)
```

```
## Denom. DF: 72
##
##           numDF    F-value p-value
## (Intercept)         1 288.74872 <.0001
## Concentracion         3   4.44062  0.0064
## Bacteria              2   0.70214  0.4989
## Semanacovariable      1  12.42595  0.0007
## Concentracion:Bacteria  6   2.75582  0.0181
## Concentracion:Semanacovariable  3   1.60339  0.1961
## Bacteria:Semanacovariable  2   0.21630  0.8060
```

Agregando variable aleatoria (semanacovariable como variable aleatoria)

```
library(lmerTest)
```

```
##
## Attaching package: 'lmerTest'

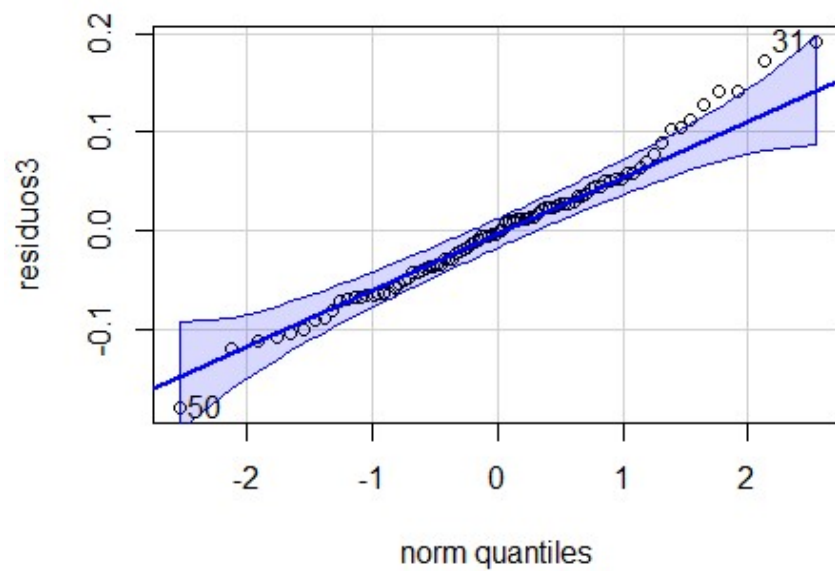
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmer

## The following object is masked from 'package:stats':
##
##      step

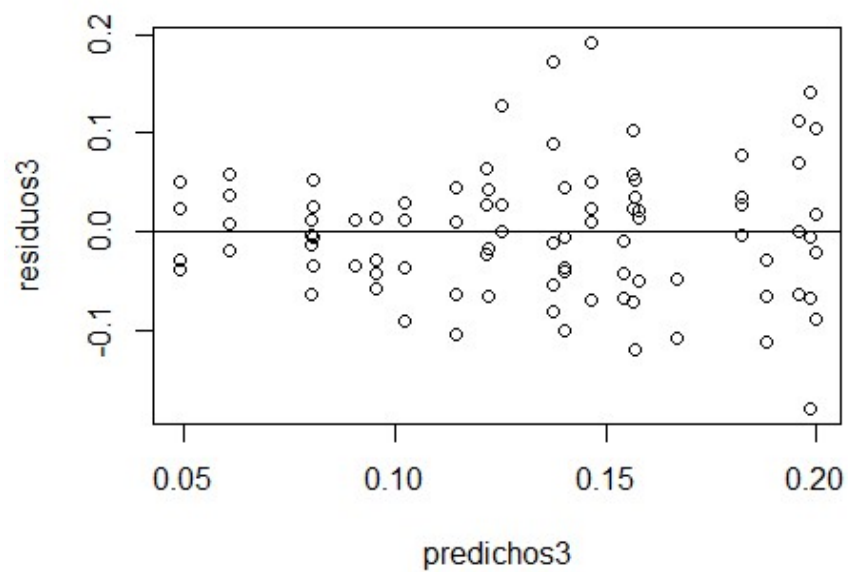
modelomixto <- lmer(Pesosecoraiz ~ Concentracion * Bacteria + (1 |
Semanacovariable), data = datos)
residuos3 <- residuals(modelomixto)
predichos3 <- fitted(modelomixto)
shapiro.test(residuos2)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98991, p-value = 0.7245

library(car)
qqPlot(residuos3)
```



```
## [1] 31 50
plot(predichos3, residuos3)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelomixto)#forma alternativa a Levene
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
(Bartlett Test, p = 0.161).
```

```
library(car)
leveneTest(datos$Pesosecoraiz ~ datos$Concentracion * datos$Bacteria)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
```

```
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  0.8567 0.5852
##      78
```

```
library(lmerTest)
```

```
anova_result <- anova(modelomixto)
```

```
anova_result
```

```
## Type III Analysis of Variance Table with Satterthwaite's method
```

```
##              Sum Sq   Mean Sq NumDF   DenDF F value   Pr(>F)
## Concentracion      0.041627 0.0138758      3  77.055   2.7032 0.05124
##
## Bacteria            0.015717 0.0078584      2  77.025   1.5310 0.22284
## Concentracion:Bacteria 0.066241 0.0110402      6  77.027   2.1508 0.05694
##
## ---
```

```
## ---
```

```
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Medias y Comparaciones entre tratamientos

```
library(emmeans) # Cargar el paquete
```

```
emm_concentracion <- emmeans(modelomixto, ~ Bacteria | Concentracion)
```

```
tukey3 <- contrast(emm_concentracion, method = "pairwise", adjust =
"tukey")
```

```
tukey3
```

```
## Concentracion = 0:
```

```
## contrast      estimate      SE    df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1  0.00115 0.0371 77.0    0.031  0.9995
## (pvalor x 2 = 1.9990)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.07792 0.0384 77.0    2.030  0.1118
## (pvalor x 2 = 0.2236)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.07676 0.0372 77.1    2.061  0.1048
## (pvalor x 2 = 0.2096)
```

```
##
```

```
## Concentracion = 25:
```

```
## contrast      estimate      SE    df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.00622 0.0348 77.0   -0.179  0.9826
## (pvalor x 2 = 1.9652)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.01515 0.0400 77.0    0.379  0.9240
## (pvalor x 2 = 1.8480)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.02136 0.0408 77.0    0.523  0.8603
## (pvalor x 2 = 1.7206)
```

```
##
```

```
## Concentracion = 75:
```

```
## contrast      estimate      SE    df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1  0.10540 0.0384 77.0    2.746  0.0203
## (pvalor x 2 = 0.0406)
```

```

## sin inocular - 44A7TWB1.1 0.05851 0.0361 77.0 1.620 0.2432
(pvalor x 2 = 0.4864)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 -0.04689 0.0362 77.0 -1.296 0.4017
(pvalor x 2 = 0.8034)
##
## Concentracion = 125:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.05400 0.0358 77.0 -1.508 0.2930
(pvalor x 2 = 0.5860)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -0.02001 0.0371 77.0 -0.539 0.8522
(pvalor x 2 = 1.7044)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 0.03400 0.0371 77.0 0.916 0.6317
(pvalor x 2 = 1.2634)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

print(emm_concentracion)

## Concentracion = 0:
## Bacteria emmean SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular 0.1788 0.0350 4.91 0.0885 0.269
## 31A6TWB2.1 0.1777 0.0337 4.23 0.0862 0.269
## 44A7TWB1.1 0.1009 0.0350 4.91 0.0106 0.191
##
## Concentracion = 25:
## Bacteria emmean SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular 0.1612 0.0325 3.72 0.0680 0.254
## 31A6TWB2.1 0.1674 0.0337 4.23 0.0759 0.259
## 44A7TWB1.1 0.1460 0.0389 7.41 0.0549 0.237
##
## Concentracion = 75:
## Bacteria emmean SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular 0.1750 0.0350 4.91 0.0846 0.265
## 31A6TWB2.1 0.0696 0.0350 4.91 -0.0208 0.160
## 44A7TWB1.1 0.1164 0.0325 3.72 0.0233 0.210
##
## Concentracion = 125:
## Bacteria emmean SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular 0.0814 0.0336 4.22 -0.0100 0.173
## 31A6TWB2.1 0.1354 0.0336 4.22 0.0440 0.227
## 44A7TWB1.1 0.1014 0.0350 4.91 0.0111 0.192
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

emm_bacteria <- emmeans(modelomixto, ~ Concentracion | Bacteria)
tukey4 <- contrast(emm_bacteria, method = "pairwise", adjust = "tukey")
tukey4

## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 0.017688 0.0362 77.0 0.489

```

```

0.9613 (pvalor x 2 = 1.9226)
## Concentracion0 - Concentracion75    0.003893 0.0383 77.0    0.102
0.9996 (pvalor x 2 = 1.9992)
## Concentracion0 - Concentracion125    0.097439 0.0371 77.0    2.626
0.0500 (pvalor x 2 = 0.1000)
## Concentracion25 - Concentracion75   -0.013795 0.0362 77.0   -0.381
0.9810 (pvalor x 2 = 1.9620)
## Concentracion25 - Concentracion125   0.079751 0.0348 77.0    2.290
0.1093 (pvalor x 2 = 0.2186)
## Concentracion75 - Concentracion125   0.093546 0.0371 77.0    2.521
0.0645 (pvalor x 2 = 0.1290)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                estimate      SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25     0.010317 0.0361 77.2    0.286
0.9918 (pvalor x 2 = 0.1290)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.108139 0.0372 77.1    2.904
0.0243 (pvalor x 2 = 0.0486)
## Concentracion0 - Concentracion125     0.042283 0.0359 77.0    1.178
0.6424 (pvalor x 2 = 1.2848)
## Concentracion25 - Concentracion75     0.097822 0.0371 77.0    2.637
0.0486 (pvalor x 2 = 0.0972)
## Concentracion25 - Concentracion125     0.031966 0.0359 77.0    0.891
0.8097 (pvalor x 2 = 1.6194)
## Concentracion75 - Concentracion125   -0.065856 0.0371 77.0   -1.775
0.2932 (pvalor x 2 = 0.5864)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                estimate      SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.045082 0.0420 77.0   -1.075
0.7060 (pvalor x 2 = 1.4120)
## Concentracion0 - Concentracion75    -0.015512 0.0362 77.0   -0.429
0.9734 (pvalor x 2 = 1.9468)
## Concentracion0 - Concentracion125   -0.000482 0.0383 77.0   -0.013
1.0000 (pvalor x 2 = 2.0000)
## Concentracion25 - Concentracion75     0.029570 0.0401 77.1    0.738
0.8814 (pvalor x 2 = 1.7628)
## Concentracion25 - Concentracion125     0.044600 0.0420 77.0    1.063
0.7129 (pvalor x 2 = 1.4258)
## Concentracion75 - Concentracion125     0.015029 0.0362 77.0    0.415
0.9757 (pvalor x 2 = 1.9514)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```

Tablas A11. Peso fresco del vástago de plantas de Festuca arundinacea inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMa,#para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

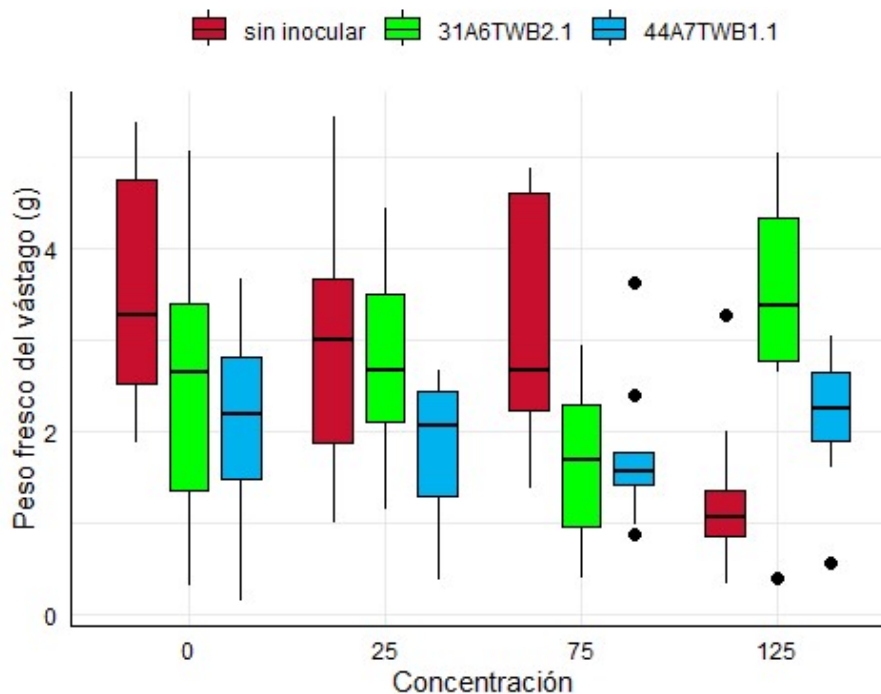
## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesofrescovastago.xlsx")
#datos$Bacteria=as.factor(datos$Bacteria)
library(dplyr)
datos <- datos %>%
mutate(Bacteria = case_when(
  Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
  Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
  Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
  TRUE ~ as.character(Bacteria)
))
```

```
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de
dato
```

Gráfico

```
library("ggplot2")
library(ggpubr)
ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Pesofrescovastago, fill =
Bacteria)) +
geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
colour = "black", lwd = 0.5) +
scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
labs(x = "Concentración",
y = "Peso fresco del vástago (g)") +
theme_minimal() +
theme(legend.position = "top",
legend.title = element_blank(),
axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
axis.text = element_text(colour = "black"),
axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```

modelo<-
lm(Pesofrescovastago~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacteria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Pesofrescovastago ~ Concentracion + Bacteria +
##   Semanacovariable +
##     Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25              2.93272              -
0.46060
##              Concentracion75
Concentracion125              -0.35571              -
2.22034
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1              -1.07869              -
1.38034
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              1.14275
0.97054
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.34664
3.10869
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.13519              -
0.06486
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##              2.31821

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values
predichos

##           1           2           3           4           5           6           7
8
## 0.7123758 0.7123758 0.7123758 0.7123758 2.7423758 2.7423758 2.7423758
2.7423758
##           9          10          11          12          13          14          15
16
## 1.6502507 1.6502507 1.6502507 1.6502507 2.5770009 2.5770009 2.5770009
1.1516792
##          17          18          19          20          21          22          23
24
## 1.1516792 1.1516792 1.1516792 1.1318064 1.1318064 1.1318064 1.1318064

```

```

2.4721118
##      25      26      27      28      29      30      31
32
## 2.4721118 2.4721118 2.4721118 2.4721118 2.3639693 2.3639693 2.3639693
2.3639693
##      33      34      35      36      37      38      39
40
## 2.3639693 1.2269591 1.2269591 1.2269591 2.9327152 2.9327152 2.9327152
1.8540286
##      41      42      43      44      45      46      47
48
## 1.8540286 1.8540286 1.5523758 1.5523758 1.5523758 1.5523758 1.8540286
4.0754636
##      49      50      51      52      53      54      55
56
## 4.0754636 4.0754636 2.9967771 2.9967771 2.9967771 2.9967771 2.9967771
2.6951242
##      57      58      59      60      61      62      63
64
## 2.6951242 2.6951242 2.6951242 4.0754636 3.6148603 3.6148603 3.6148603
3.6148603
##      65      66      67      68      69      70      71
72
## 3.5067178 3.5067178 3.5067178 2.3697076 2.3697076 2.3697076 3.7197493
3.7197493
##      73      74      75      76      77      78      79
80
## 3.7197493 3.7197493 2.2944277 2.2944277 2.2944277 2.2745549 2.2745549
2.2745549
##      81      82      83      84      85      86      87
88
## 2.2745549 2.2745549 1.8551242 1.8551242 1.8551242 1.8551242 3.8851242
3.8851242
##      89      90      91      92      93
## 3.8851242 3.8851242 2.7929991 2.7929991 2.7929991

```

Supuestos modelo

```
library(car)
```

```
## Loading required package: carData
```

```
##
```

```
## Attaching package: 'car'
```

```
## The following object is masked from 'package:DescTools':
```

```
##
```

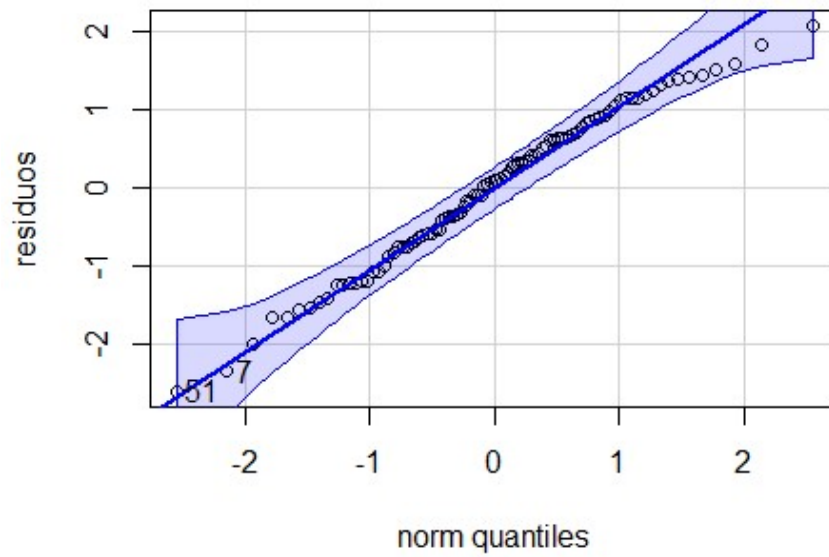
```
##      Recode
```

```
## The following object is masked from 'package:dplyr':
```

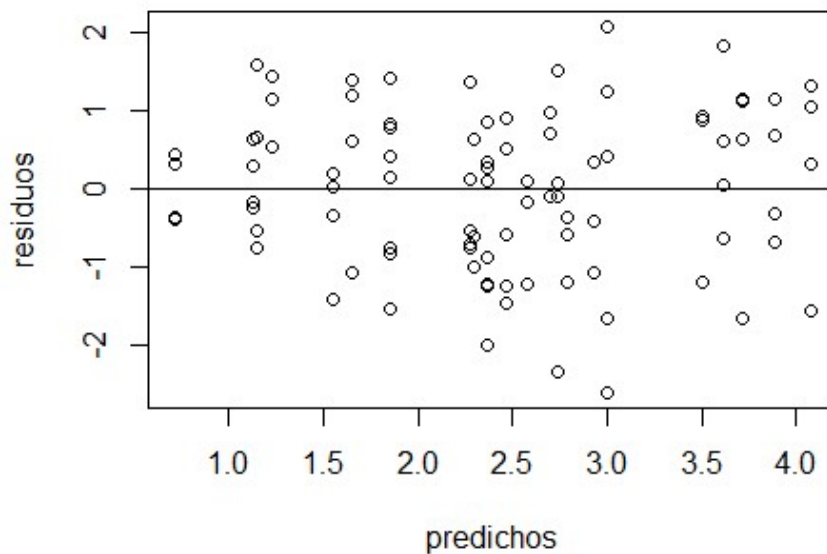
```
##
```

```
##      recode
```

```
## The following object is masked from 'package:purrr':  
##  
##      some  
qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 51 7  
plot(predichos, residuos)  
abline(0,0)
```



```
shapiro.test(residuos)
```

```
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.98565, p-value = 0.4046
```

```
leveneTest(Pesofrescovastago~Concentracion*Bacteria, data=datos, center =
mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.0586 0.4048
##      81
```

Anova modelo

```
anova(modelo)
```

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Pesofrescovastago
##
##      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Concentracion      3  4.552   1.5175   1.3129 0.2760013
## Bacteria            2  9.874   4.9371   4.2716 0.0172737 *
## Semanacovariable    1 30.857  30.8573  26.6979 1.708e-06 ***
## Concentracion:Bacteria  6 31.059   5.1764   4.4787 0.0005857 ***
## Residuals          80 92.464   1.1558
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Modelo nuevo por efecto de la covariable

```

modelonuevocovariable<-
lm(Pesofrescovastago~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacteria+Concentracion:Semanacovariable +Bacteria:Semanacovariable,
data=datos)
residuos2=modelonuevocovariable$residuals
predichos2=modelonuevocovariable$fitted.values
predichos2

```

##	1	2	3	4	5	6	7
8							
##	0.5446065	0.5446065	0.5446065	0.5446065	2.8725644	2.8725644	2.8725644
2.8725644							
##	9	10	11	12	13	14	15
16							
##	2.0103291	2.0103291	2.0103291	2.0103291	2.2302249	2.2302249	2.2302249
1.1469897							
##	17	18	19	20	21	22	23
24							
##	1.1469897	1.1469897	1.1469897	1.4478416	1.4478416	1.4478416	1.4478416
2.2940705							
##	25	26	27	28	29	30	31
32							
##	2.2940705	2.2940705	2.2940705	2.2940705	2.4372154	2.4372154	2.4372154
2.4372154							
##	33	34	35	36	37	38	39
40							
##	2.4372154	1.6145234	1.6145234	1.6145234	2.3735155	2.3735155	2.3735155
1.6414266							
##	41	42	43	44	45	46	47
48							
##	1.6414266	1.6414266	1.6509368	1.6509368	1.6509368	1.6509368	1.6414266
4.4948634							
##	49	50	51	52	53	54	55
56							
##	4.4948634	4.4948634	3.1668587	3.1668587	3.1668587	3.1668587	3.1668587
2.5965632							
##	57	58	59	60	61	62	63
64							
##	2.5965632	2.5965632	2.5965632	4.4948634	3.8374118	3.8374118	3.8374118
3.8374118							
##	65	66	67	68	69	70	71
72							
##	3.3846410	3.3846410	3.3846410	1.9821433	1.9821433	1.9821433	3.9798313
3.9798313							
##	73	74	75	76	77	78	79
80							
##	3.9798313	3.9798313	2.3006804	2.3006804	2.3006804	2.0217267	2.0217267
2.0217267							
##	81	82	83	84	85	86	87
88							
##	2.0217267	2.0217267	2.0228935	2.0228935	2.0228935	2.0228935	3.7549356
3.7549356							

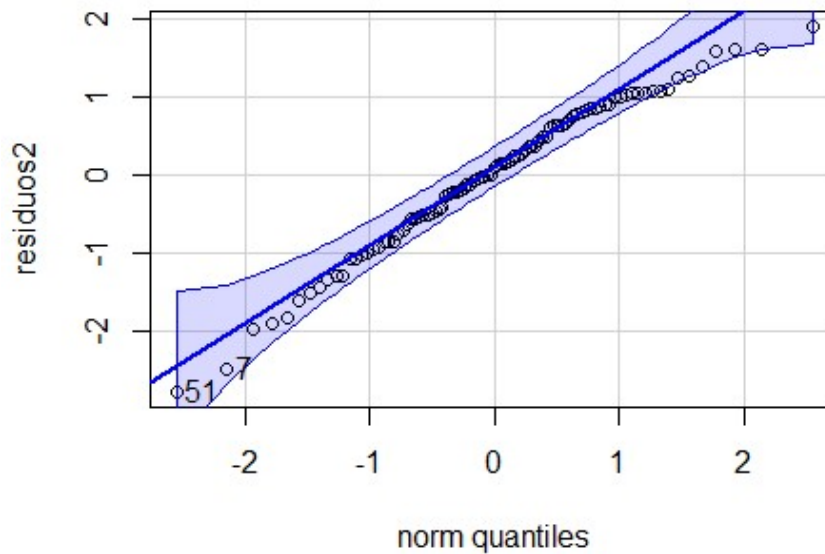
```
##      89      90      91      92      93
## 3.7549356 3.7549356 2.3128946 2.3128946 2.3128946
```

Supuestos nuevo modelo

```
shapiro.test(residuos2)
```

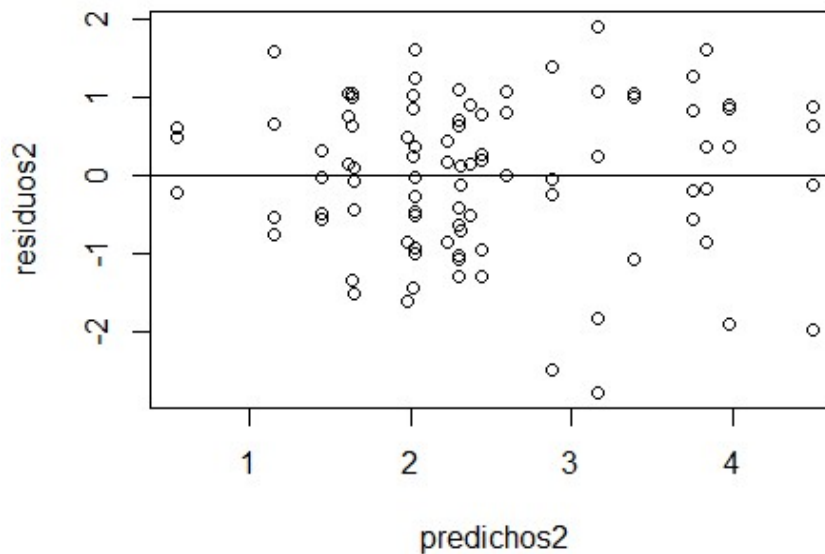
```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.97865, p-value = 0.1315
```

```
library(car)
qqPlot(residuos2)
```



```
## [1] 51 7
```

```
plot(predichos2, residuos2)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Pesofrescovastago~Concentracion*Bacteria*Semanacovariable,
data=datos, center = mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 23  1.3913 0.1477
##      69
```

Modelado de varianza de modelo con covariable

```
library(nlme)
```

```
##
## Attaching package: 'nlme'

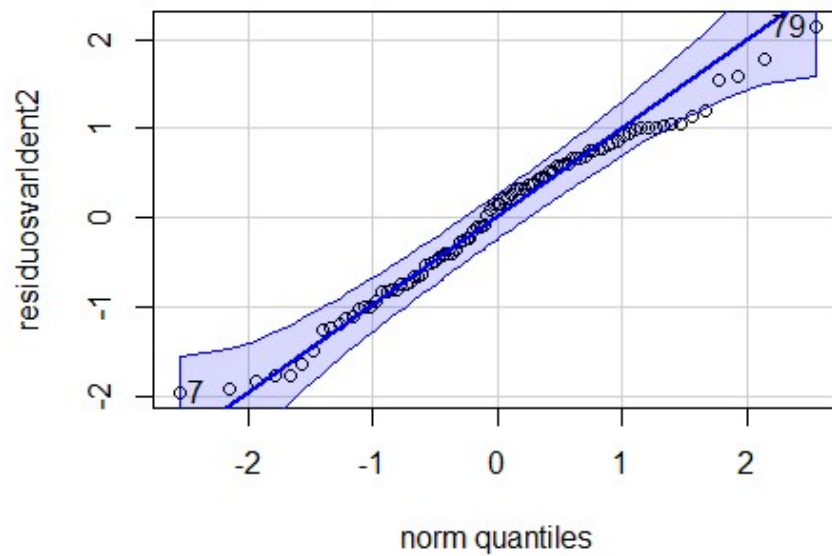
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      collapse

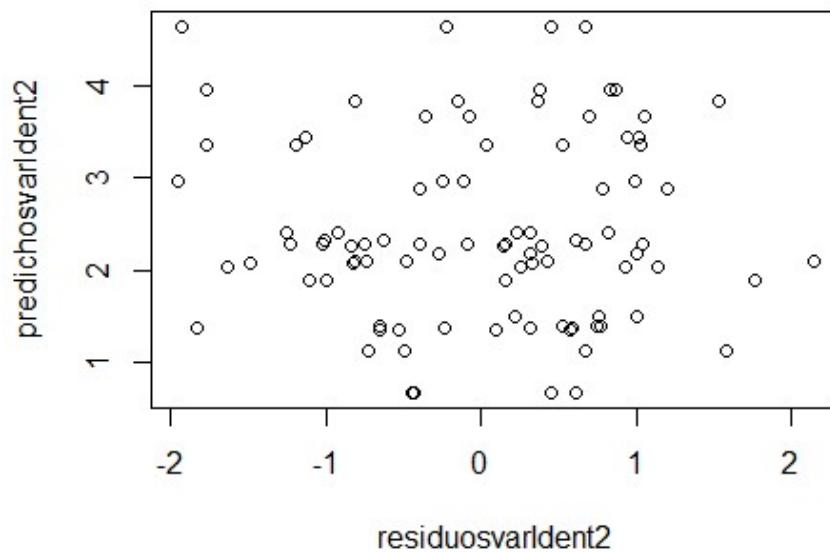
modelo_Varident2 <- gls(Pesofrescovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1
| Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent2<-resid(modelo_Varident2, type = "pearson")
predichosvarIdent2<-fitted(modelo_Varident2)
shapiro.test(residuosvarIdent2)
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent2
## W = 0.97997, p-value = 0.164
```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarIdent2)
```



```
## [1] 79 7
plot(residuosvarIdent2, predichosvarIdent2)
abline(0,0)
```



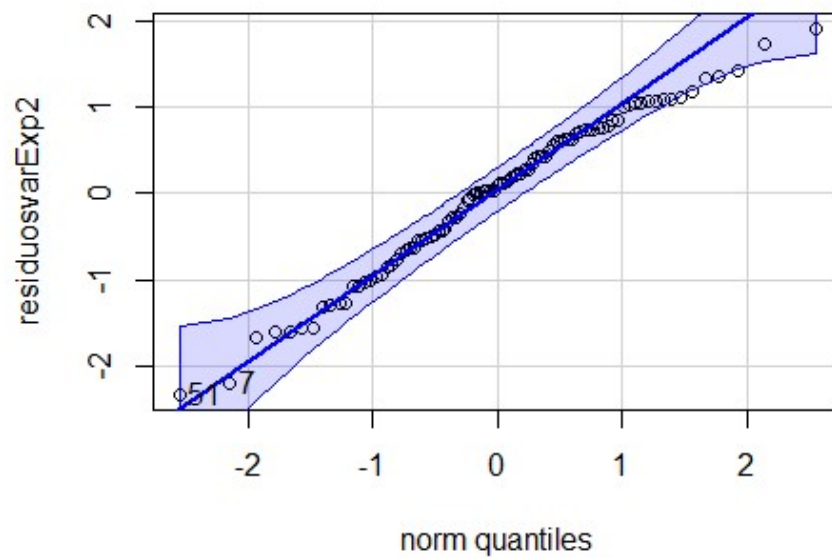
```

modelo_VarExp2 <- gls( Pesofrescovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights =
varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp2<-resid(modelo_VarExp2, type = "pearson")
predichosvarExp2<-fitted(modelo_VarExp2)
shapiro.test(residuosvarExp2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp2
## W = 0.98136, p-value = 0.2064

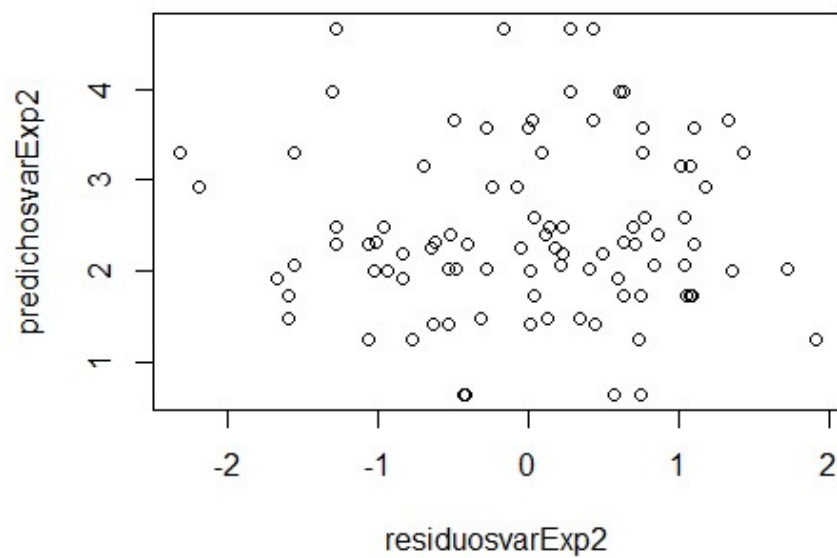
library(car)
qqPlot(residuosvarExp2)

```



```
## [1] 51 7
```

```
plot(residuosvarExp2, predichosvarExp2)
abline(0,0)
```



```
modelo_varPower2 <- gls( Pesofrescovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovvariable+Concentracion:Semanacovvariable
+Bacteria:Semanacovvariable, data = datos, weights =
```

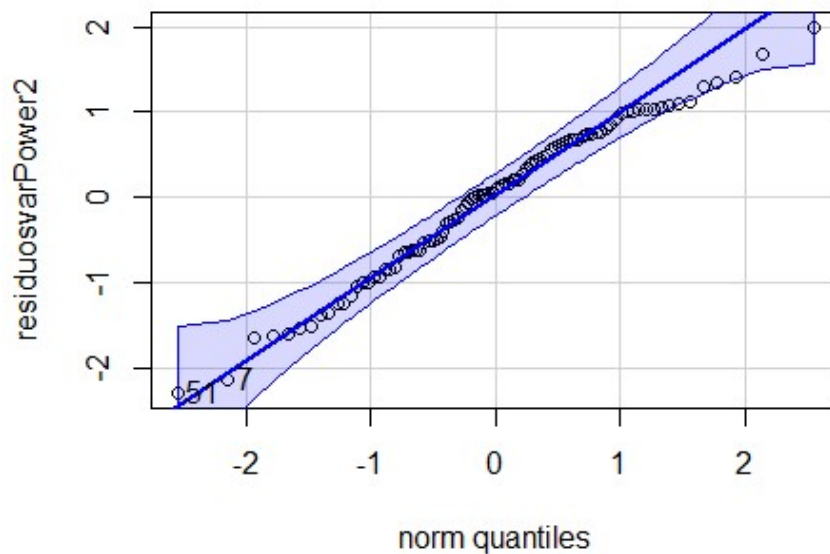
```

varPower(form=~fitted(.))
residuosvarPower2<-resid(modelo_varPower2, type = "pearson")
predichosvarPower2<-fitted(modelo_varPower2)
shapiro.test(residuosvarPower2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower2
## W = 0.98083, p-value = 0.1891

library(car)
qqPlot(residuosvarPower2)

```

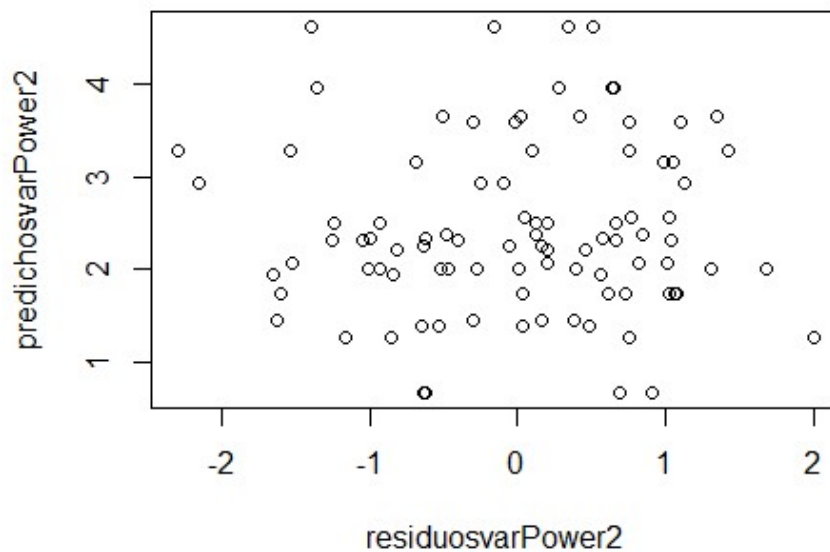


```

## [1] 51 7

plot(residuosvarPower2,predichosvarPower2)
abline(0,0)

```



```
AIC(modelo_Varident2, modelo_VarExp2, modelo_varPower2)
```

```
##              df      AIC
## modelo_Varident2 30 308.3757
## modelo_VarExp2   20 292.6200
## modelo_varPower2 20 291.6559
```

Anova nuevo modelo con covariable y varianza modelada

```
anova(modelo_varPower2)
```

```
## Denom. DF: 75
##
##              numDF  F-value p-value
## (Intercept)          1 396.4226 <.0001
## Concentracion         3   3.4594  0.0205
## Bacteria              2   1.6015  0.2084
## Semanacovariable       1 28.9367 <.0001
## Concentracion:Bacteria  6   5.1152  0.0002
## Concentracion:Semanacovariable 3   0.5874  0.6252
## Bacteria:Semanacovariable  2   2.3269  0.1046
```

Agregando variable aleatoria (semanacovariable como variable aleatoria)

```
library(lmerTest)
```

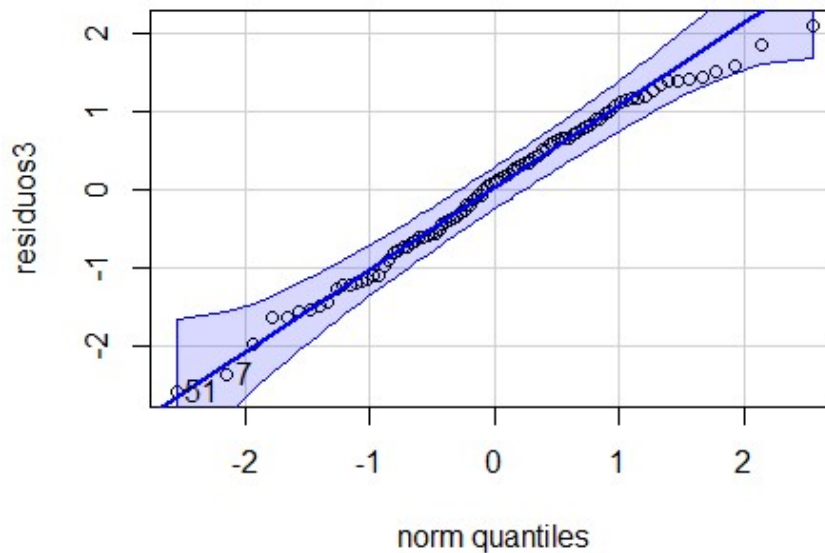
```
##
## Attaching package: 'lmerTest'
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmer
```

```
## The following object is masked from 'package:stats':
##
##      step

modelomixto <- lmer(Pesofrescovastago ~ Concentracion * Bacteria + (1 |
Semanacovariable), data = datos)
residuos3 <- residuals(modelomixto)
predichos3 <- fitted(modelomixto)
shapiro.test(residuos2)

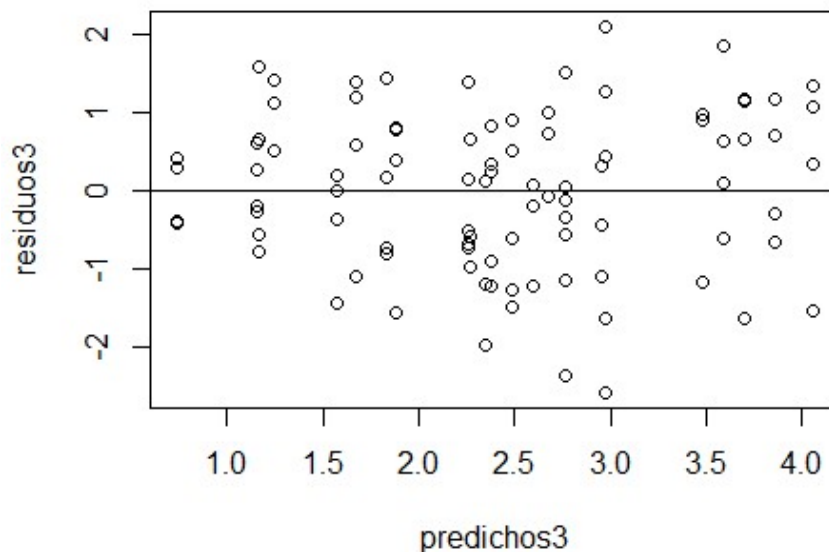
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.97865, p-value = 0.1315

library(car)
qqPlot(residuos3)
```



```
## [1] 51 7

plot(predichos3, residuos3)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelomixto)#forma alternativa a Levene

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.718).

library(lmerTest)
anova_result <- anova(modelomixto)
anova_result

## Type III Analysis of Variance Table with Satterthwaite's method
##               Sum Sq Mean Sq NumDF  DenDF F value    Pr(>F)
## Concentracion    3.9782   1.3261     3  80.013   1.1473 0.3351971
## Bacteria         10.3708   5.1854     2  80.007   4.4864 0.0142327
## *
## Concentracion:Bacteria 31.0882   5.1814     6  80.007   4.4829 0.0005808
## ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(emmeans) # Cargar el paquete
emm_concentracion <- emmeans(modelomixto, ~ Bacteria | Concentracion)
tukey3 <- contrast(emm_concentracion, method = "pairwise", adjust =
"tukey")
tukey3

## Concentracion = 0:
## contrast              estimate    SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1    1.0794 0.542 80    1.992  0.1207
## (pvalor x 2 = 0.2414)
## sin inocular - 44A7TWB1.1    1.3835 0.557 80    2.485  0.0395
```

```

(pvalor x 2 = 0.0790)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1      0.3041 0.523 80    0.582 0.8301
(pvalor x 2 = 1.6602)
##
## Concentracion = 25:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1  0.1112 0.523 80    0.213 0.9754
(pvalor x 2 = 1.9508)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  1.2427 0.567 80    2.193 0.0786
(pvalor x 2 = 0.1572)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    1.1315 0.581 80    1.946 0.1325
(pvalor x 2 = 0.1572)
##
## Concentracion = 75:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1  1.4316 0.576 80    2.487 0.0393
(pvalor x 2 = 0.0786)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  1.4459 0.542 80    2.669 0.0247
(pvalor x 2 = 0.0494)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.0143 0.543 80    0.026 0.9996
(pvalor x 2 = 1.9992)
##
## Concentracion = 125:
## contrast      estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -2.0300 0.538 80   -3.776 0.0009
(pvalor x 2 = 0.0018)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -0.9347 0.557 80   -1.679 0.2195
(pvalor x 2 = 0.4390)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    1.0953 0.557 80    1.968 0.1269
(pvalor x 2 = 0.2538)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

print(emm_concentracion)

## Concentracion = 0:
## Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## sin inocular  3.51 0.692 2.15   0.7176    6.30
## 31A6TWB2.1    2.43 0.665 1.83  -0.6981    5.55
## 44A7TWB1.1    2.12 0.677 1.97  -0.8366    5.08
##
## Concentracion = 25:
## Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## sin inocular  3.04 0.665 1.83  -0.0850    6.17
## 31A6TWB2.1    2.93 0.678 1.97  -0.0245    5.88
## 44A7TWB1.1    1.80 0.712 2.40  -0.8250    4.42
##
## Concentracion = 75:
## Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
## sin inocular  3.15 0.692 2.15   0.3619    5.94
## 31A6TWB2.1    1.72 0.692 2.15  -1.0698    4.51
## 44A7TWB1.1    1.71 0.665 1.83  -1.4204    4.83
##

```

```
## Concentracion = 125:
## Bacteria      emmean    SE    df lower.CL upper.CL
## sin inocular  1.28 0.677 1.97 -1.6766    4.24
## 31A6TWB2.1    3.31 0.677 1.97  0.3534    6.27
## 44A7TWB1.1    2.22 0.692 2.15 -0.5712    5.01
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

emm_bacteria <- emmeans(modelomixto, ~ Concentracion | Bacteria)
tukey4 <- contrast(emm_bacteria, method = "pairwise", adjust = "tukey")
tukey4

## Bacteria = sin inocular:
## contrast                estimate    SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    0.4662 0.543 80  0.859 0.8257
## (pvalor x 2 = 1.6514)
## Concentracion0 - Concentracion75    0.3557 0.575 80  0.619 0.9257
## (pvalor x 2 = 1.8514)
## Concentracion0 - Concentracion125    2.2235 0.557 80  3.994 0.0008
## (pvalor x 2 = 0.0016)
## Concentracion25 - Concentracion75   -0.1105 0.543 80 -0.204 0.9970
## (pvalor x 2 = 1.9940)
## Concentracion25 - Concentracion125    1.7573 0.523 80  3.363 0.0064
## (pvalor x 2 = 0.0128)
## Concentracion75 - Concentracion125    1.8678 0.557 80  3.355 0.0065
## (pvalor x 2 = 0.0130)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                estimate    SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25   -0.5020 0.524 80 -0.958 0.7737
## (pvalor x 2 = 1.5474)
## Concentracion0 - Concentracion75    0.7080 0.543 80  1.305 0.5627
## (pvalor x 2 = 1.1254)
## Concentracion0 - Concentracion125   -0.8859 0.523 80 -1.695 0.3329
## (pvalor x 2 = 0.6658)
## Concentracion25 - Concentracion75    1.2099 0.557 80  2.174 0.1394
## (pvalor x 2 = 0.2788)
## Concentracion25 - Concentracion125   -0.3839 0.538 80 -0.713 0.8916
## (pvalor x 2 = 1.7832)
## Concentracion75 - Concentracion125   -1.5939 0.557 80 -2.863 0.0269
## (pvalor x 2 = 0.0538)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                estimate    SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    0.3254 0.581 80  0.560 0.9434
## (pvalor x 2 = 1.8868)
## Concentracion0 - Concentracion75    0.4181 0.523 80  0.800 0.8542
## (pvalor x 2 = 1.7084)
## Concentracion0 - Concentracion125   -0.0947 0.557 80 -0.170 0.9982
## (pvalor x 2 = 1.9964)
## Concentracion25 - Concentracion75    0.0927 0.567 80  0.164 0.9984
## (pvalor x 2 = 1.9968)
## Concentracion25 - Concentracion125   -0.4201 0.598 80 -0.702 0.8959
```

```

(pvalor x 2 = 1.7918)
## Concentracion75 - Concentracion125 -0.5128 0.543 80 -0.945 0.7806
(pvalor x 2 = 1.5612)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

print(emm_bacteria)

## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 3.51 0.692 2.15 0.7176 6.30
## 25 3.04 0.665 1.83 -0.0850 6.17
## 75 3.15 0.692 2.15 0.3619 5.94
## 125 1.28 0.677 1.97 -1.6766 4.24
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 2.43 0.665 1.83 -0.6981 5.55
## 25 2.93 0.678 1.97 -0.0245 5.88
## 75 1.72 0.692 2.15 -1.0698 4.51
## 125 3.31 0.677 1.97 0.3534 6.27
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 2.12 0.677 1.97 -0.8366 5.08
## 25 1.80 0.712 2.40 -0.8250 4.42
## 75 1.71 0.665 1.83 -1.4204 4.83
## 125 2.22 0.692 2.15 -0.5712 5.01
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

```

Tablas A12. Peso seco del vástago de plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMa, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

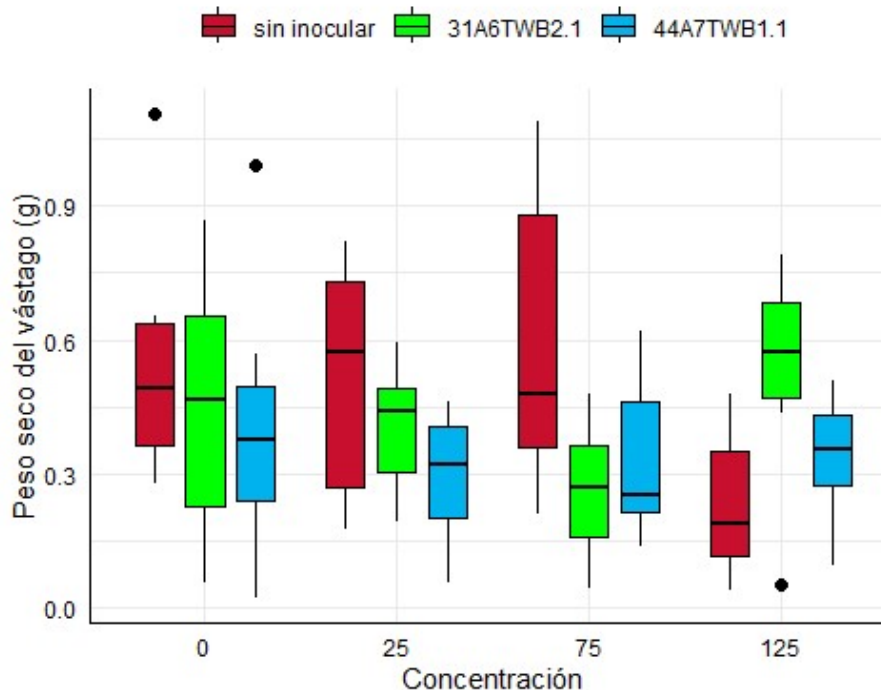
## Installing package into 'C:/Users/ailen/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/ailen/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesosecovastago.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
mutate(Bacteria = case_when(
  Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
  Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
  Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
  TRUE ~ as.character(Bacteria)
))
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de dato
```

Gráfico

```
library("ggplot2")
library(ggpubr)
ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Pesosecovastago, fill = Bacteria)) +
geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color = Bacteria),
colour = "black", lwd = 0.5) +
scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
labs(x = "Concentración",
y = "Peso seco del vástago (g)") +
theme_minimal() +
theme(legend.position = "top",
legend.title = element_blank(),
axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
axis.text = element_text(colour = "black"),
axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```
modelo<-
lm(Pesosecovastago~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:
```

```

Bacteria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Pesosecovastago ~ Concentracion + Bacteria +
Semanacovariable +
##      Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25              0.45422 -
0.04150
##              Concentracion75
Concentracion125              0.02895 -
0.33757
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1              -0.13697 -
0.15481
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              0.21666
0.06429
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.17662
0.44992
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##              -0.07349 -
0.12263
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.28391

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Chequeo supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.99629, p-value = 0.9974

library(car)

## Loading required package: carData

```

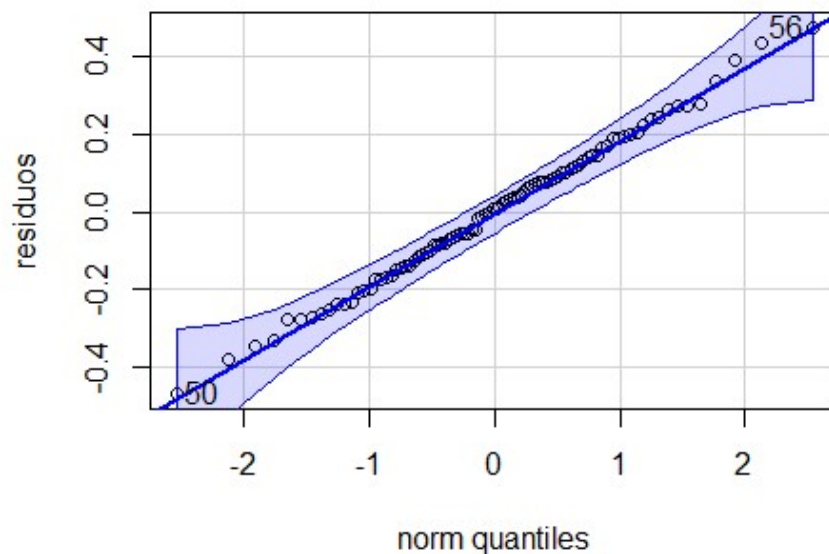
```
##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##      Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      recode

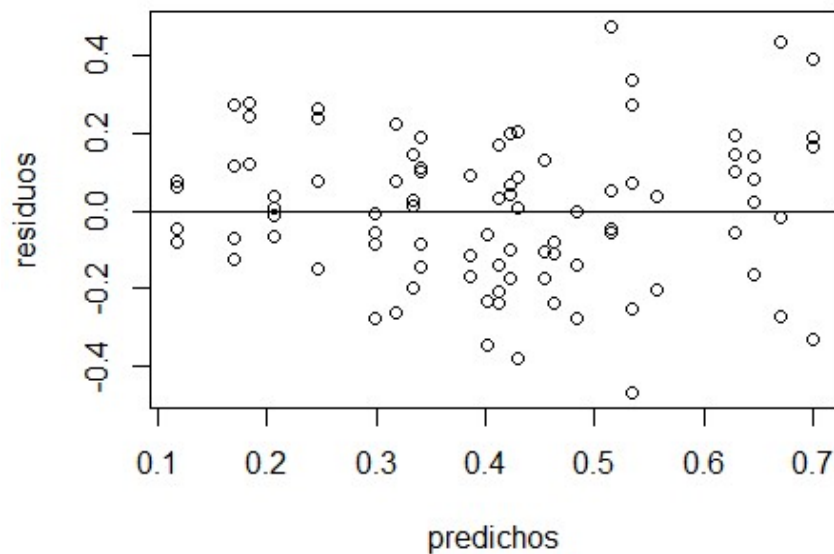
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 56 50

plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Pesosecovastago~Concentracion*Bacteria, data=datos, center =
mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.9294 0.04789 *
##      78
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
library(performance)
check_homogeneity(modelo)
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
(Bartlett Test, p = 0.375).
```

Modelado de varianza

```
library(nlme)
```

```
##
## Attaching package: 'nlme'

## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      collapse
```

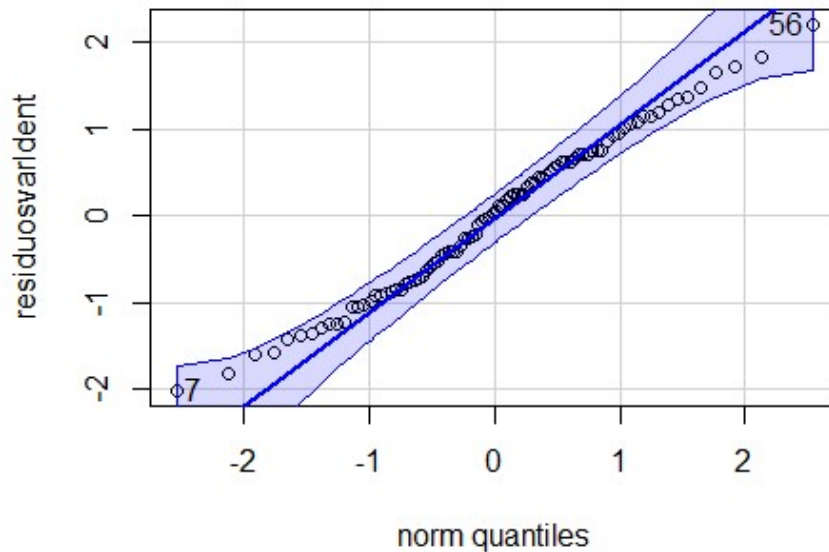
```

modelo_Varident <- gls(Pesosecovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1 |
Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent<-resid(modelo_Varident, type = "pearson")
predichosvarIdent<-fitted(modelo_Varident)
shapiro.test(residuosvarIdent)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent
## W = 0.98788, p-value = 0.5759

library(car)
qqPlot(residuosvarIdent)

```

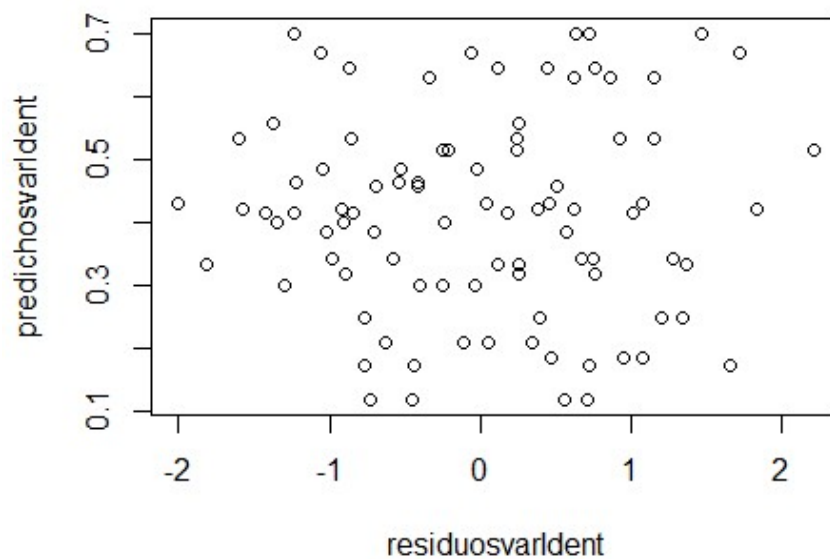


```

## [1] 56 7

plot(residuosvarIdent,predichosvarIdent)
abline(0,0)

```



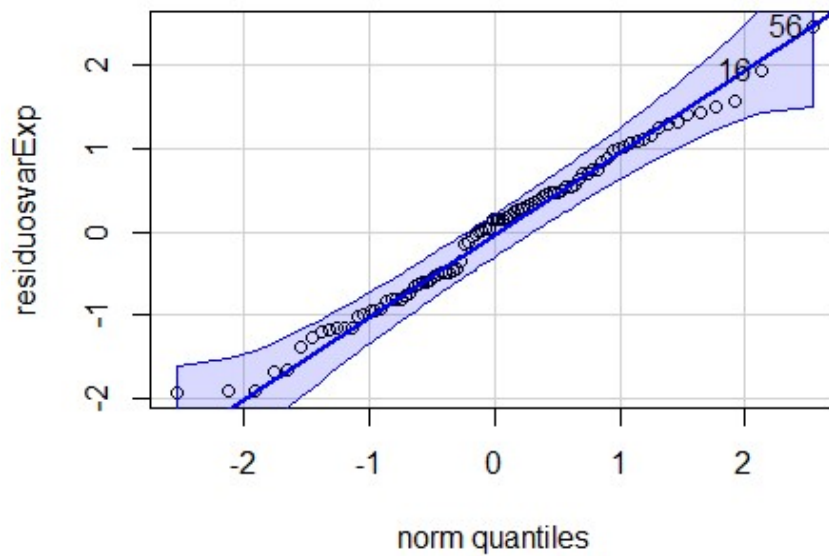
```

modelo_VarExp <- gls( Pesosecovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp<-resid(modelo_VarExp, type = "pearson")
predichosvarExp<-fitted(modelo_VarExp)
shapiro.test(residuosvarExp)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp
## W = 0.988, p-value = 0.5845

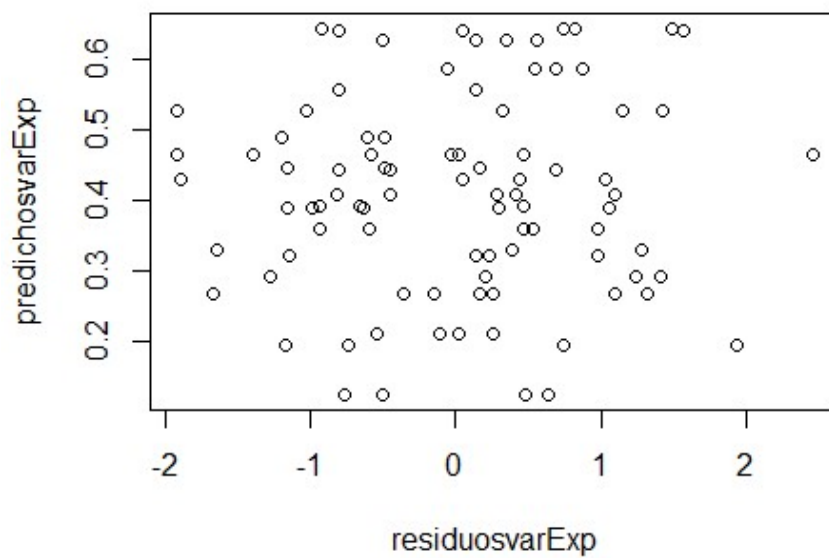
library(car)
qqPlot(residuosvarExp)

```



```
## [1] 56 16
```

```
plot(residuosvarExp,predichosvarExp)
abline(0,0)
```

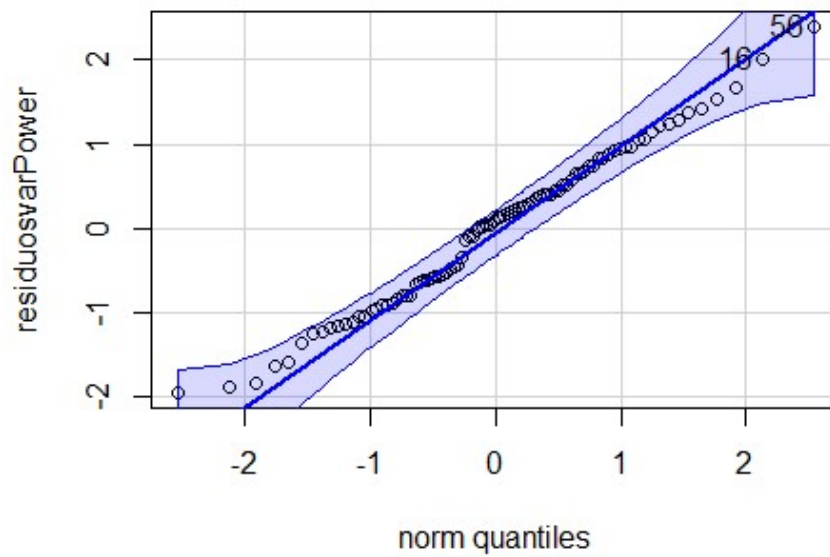


```
modelo_varPower <- gls( Pesosecovastago ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovvariable, data = datos, weights = varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower<-resid(modelo_varPower, type = "pearson")
```

```
predichosvarPower<-fitted(modelo_varPower)
shapiro.test(residuosvarPower)
```

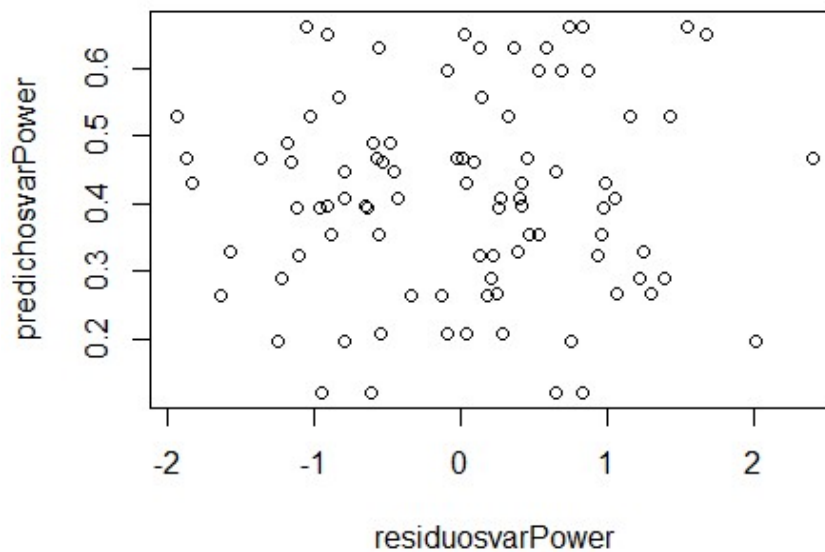
```
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower
## W = 0.98838, p-value = 0.6118
```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarPower)
```



```
## [1] 56 16
```

```
plot(residuosvarPower,predichosvarPower)
abline(0,0)
```



```
AIC(modelo_Varident, modelo_VarExp, modelo_varPower)
```

```
##              df      AIC
## modelo_Varident 25 34.57041
## modelo_VarExp   15 21.61681
## modelo_varPower 15 20.86392
```

```
leveneTest(residuosvarPower ~ Concentracion * Bacteria, data = datos,
center = mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.2668 0.2594
##      78
```

```
Anova(modelo_varPower)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: Pesosecovastago
##              Df    Chisq Pr(>Chisq)
## Concentracion    3   8.4915  0.0368748 *
## Bacteria          2   1.0991  0.5771992
## Semanacovariable    1 24.1648 8.844e-07 ***
## Concentracion:Bacteria  6 23.2075 0.0007299 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA

```
Anova(modelo_varPower)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: Pesosecovastago
##           Df    Chisq Pr(>Chisq)
## Concentracion      3  8.4915  0.0368748 *
## Bacteria            2  1.0991  0.5771992
## Semanacovariable    1 24.1648  8.844e-07 ***
## Concentracion:Bacteria  6 23.2075  0.0007299 ***
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Modelo nuevo considerando la covariable

```
modelonuevocovariable<-
lm(Pesosecovastago~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:
Bacteria+Concentracion:Semanacovariable +Bacteria:Semanacovariable,
data=datos)
residuos2=modelonuevocovariable$residuals
predichos2=modelonuevocovariable$fitted.values
predichos2
```

##	1	2	3	4	5	6
7						
##	0.08047653	0.08047653	0.08047653	0.08047653	0.48773699	0.48773699
##	8	9	10	11	12	13
14						
##	0.48773699	0.31403648	0.31403648	0.31403648	0.31403648	0.37259896
##	15	16	17	18	19	20
21						
##	0.37259896	0.16748676	0.16748676	0.16748676	0.16748676	0.22693902
##	22	23	24	25	26	27
28						
##	0.22693902	0.22693902	0.39617401	0.39617401	0.39617401	0.39617401
##	29	30	31	32	33	34
35						
##	0.38329641	0.38329641	0.38329641	0.38329641	0.38329641	0.28164929
##	36	37	38	39	40	41
42						
##	0.28164929	0.32880899	0.32880899	0.32880899	0.27837431	0.27837431
##	43	44	45	46	47	48
49						
##	0.28983752	0.28983752	0.28983752	0.28983752	0.79629101	0.79629101
##	50	51	52	53	54	55
56						
##	0.55723541	0.55723541	0.55723541	0.55723541	0.55723541	0.52563748
##	57	58	59	60	61	62

```

63
## 0.52563748 0.52563748 0.65005749 0.65005749 0.65005749 0.65005749
0.44855897
##          64          65          66          67          68          69
70
## 0.44855897 0.30385071 0.30385071 0.30385071 0.78275078 0.78275078
0.78275078
##          71          72          73          74          75          76
77
## 0.78275078 0.38901766 0.38901766 0.38901766 0.40540878 0.40540878
0.40540878
##          78          79          80          81          82          83
84
## 0.40540878 0.40540878 0.36947347 0.36947347 0.36947347 0.36947347
0.58811301
##          85          86          87          88          89          90
## 0.58811301 0.58811301 0.58811301 0.37135136 0.37135136 0.37135136

```

```
shapiro.test(residuos2)
```

```

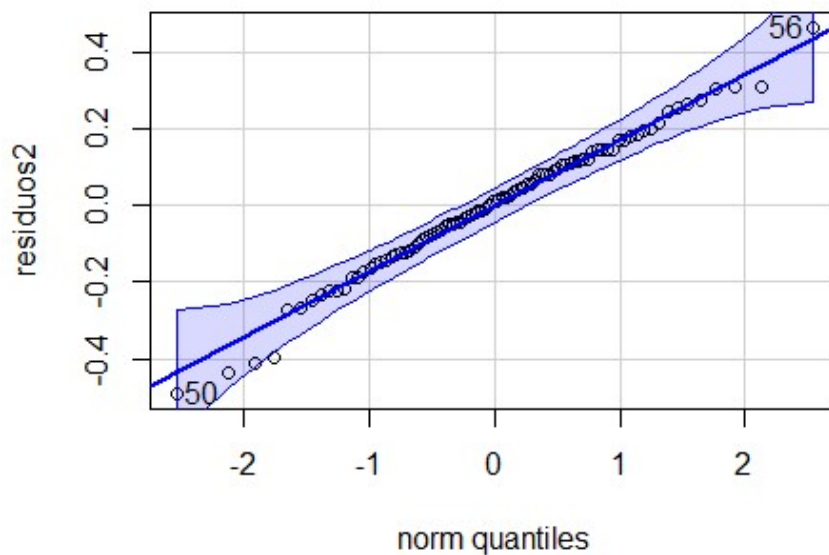
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98941, p-value = 0.6879

```

```

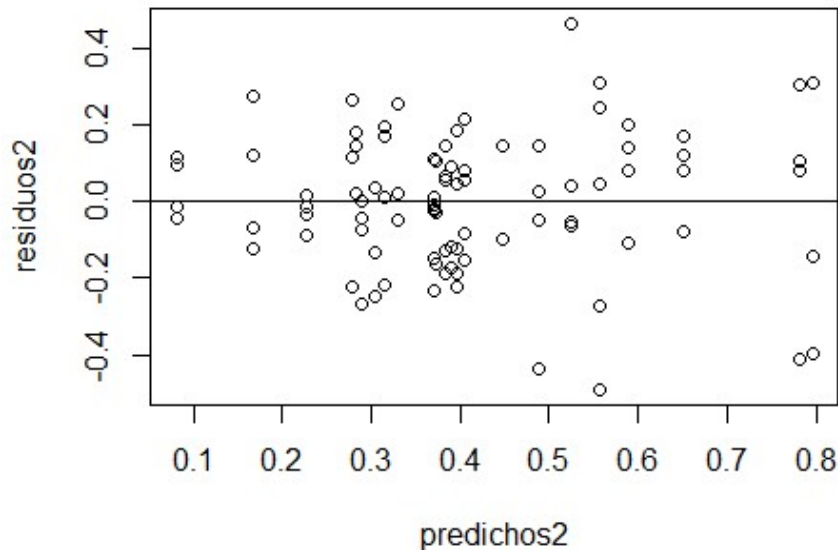
library(car)
qqPlot(residuos2)

```



```
## [1] 50 56
```

```
plot(predichos2, residuos2)
abline(0,0)
```



`anova(modelonuevocovariable)` *# Lo que paso acá es que el modelo original presento efectos significativos sde la covariable, entonces pruebo con este nuevo modelo si tiene interaccion con los otros dos factores. como da no significativo, tiene el mismo efecto para todos los tratamientos, entonces puedo sacar esta interaccion del modelo, es decir, usar el anova original*

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Pesosecovastago
##
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	3	0.11758	0.03919	1.0081	0.394264
Bacteria	2	0.24453	0.12227	3.1449	0.049042 *
Semanacovariable	1	1.05365	1.05365	27.1020	1.753e-06

Concentracion:Bacteria	6	0.86511	0.14419	3.7087	0.002871 **
Concentracion:Semanacovariable	3	0.12193	0.04064	1.0454	0.377797
Bacteria:Semanacovariable	2	0.22147	0.11073	2.8483	0.064491 .
Residuals	72	2.79915	0.03888		
## ---					
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

```
install.packages("emmeans")
library(performance)
check_homogeneity(modelonuevocovariable) #forma alternativa a Levene
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
(Bartlett Test, p = 0.375).
```

Agregando variable aleatoria (semanacovvariable como variable aleatoria)

```
library(lmerTest)

##
## Attaching package: 'lmerTest'

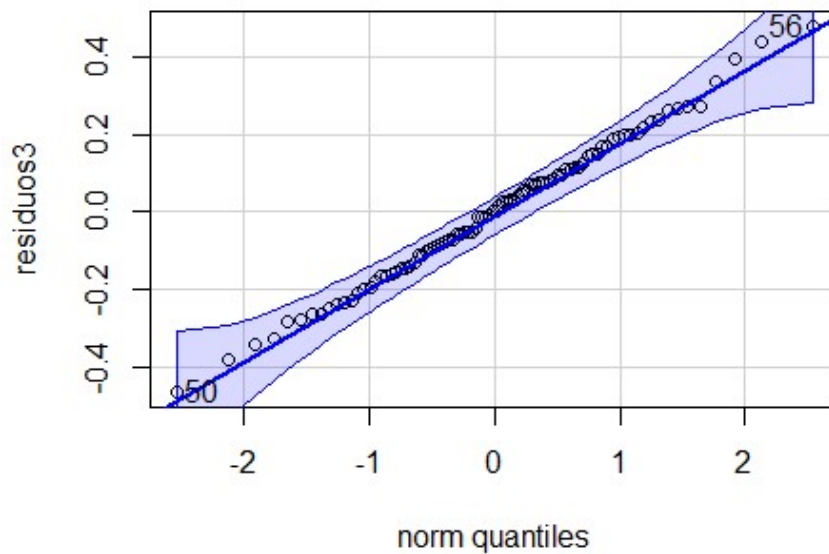
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##     lmer

## The following object is masked from 'package:stats':
##
##     step

modelomixto <- lmer(Pesosecovastago ~ Concentracion * Bacteria + (1 |
Semanacovvariable), data = datos)
residuos3 <- residuals(modelomixto)
predichos3 <- fitted(modelomixto)
shapiro.test(residuos2)

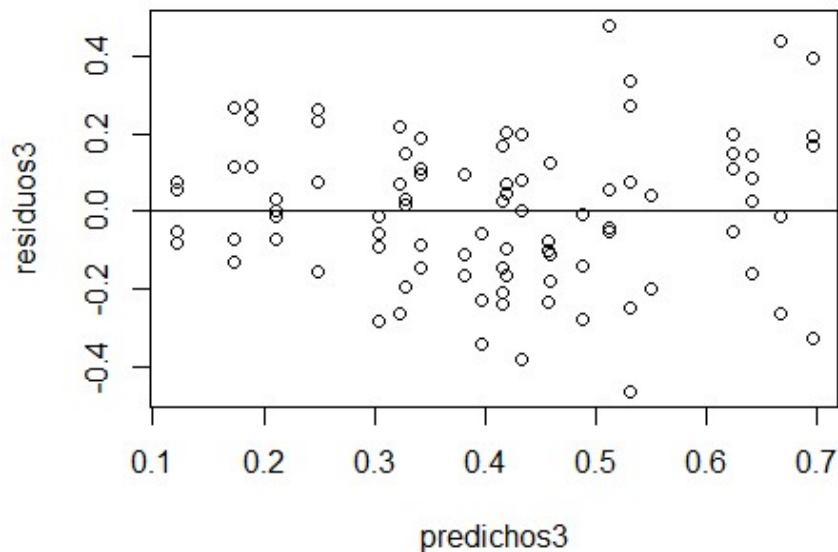
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98941, p-value = 0.6879

library(car)
qqPlot(residuos3)
```



```
## [1] 56 50
```

```
plot(predichos3, residuos3)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelomixto)#forma alternativa a Levene

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.202).

library(car)
leveneTest(datos$Pesosecovastago ~ datos$Concentracion * datos$Bacteria)

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.3515 0.2131
##      78

library(lmerTest)
anova_result <- anova(modelomixto)
anova_result

## Type III Analysis of Variance Table with Satterthwaite's method
##               Sum Sq Mean Sq NumDF  DenDF F value    Pr(>F)
## Concentracion    0.10668  0.03556     3  77.020   0.8713 0.45976
## Bacteria          0.26270  0.13135     2  77.005   3.2184 0.04546 *
## Concentracion:Bacteria 0.86555  0.14426     6  77.015   3.5347 0.00383 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(emmeans) # Cargar el paquete
emm_concentracion <- emmeans(modelomixto, ~ Bacteria | Concentracion)
emm_concentracion
```

```

## Concentracion = 0:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular  0.563 0.134 2.36  -0.0614  1.064
##   31A6TWB2.1    0.427 0.128 1.95  -0.1387  0.992
##   44A7TWB1.1    0.408 0.128 1.94  -0.1588  0.974
##
## Concentracion = 25:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular  0.521 0.126 1.81  -0.0780  1.119
##   31A6TWB2.1    0.447 0.131 2.14  -0.0845  0.978
##   44A7TWB1.1    0.293 0.134 2.36  -0.2084  0.794
##
## Concentracion = 75:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular  0.592 0.131 2.12  -0.0586  1.126
##   31A6TWB2.1    0.277 0.131 2.12  -0.2562  0.811
##   44A7TWB1.1    0.315 0.126 1.81  -0.2840  0.913
##
## Concentracion = 125:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular  0.225 0.128 1.94  -0.3416  0.792
##   31A6TWB2.1    0.538 0.128 1.94  -0.0286  1.104
##   44A7TWB1.1    0.353 0.131 2.12  -0.1800  0.887
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

tukey3 <- contrast(emm_concentracion, method = "pairwise", adjust =
"tukey")
tukey3

## Concentracion = 0:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  0.1359 0.109 77  1.244  0.4313
##   (pvalor x 2 = 0.8626)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  0.1548 0.109 77  1.419  0.3363
##   (pvalor x 2 = 0.6726)
##   31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.0189 0.101 77  0.187  0.9809
##   (pvalor x 2 = 1.9618)
##
## Concentracion = 25:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  0.0740 0.102 77  0.725  0.7492
##   (pvalor x 2 = 1.4984)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  0.2278 0.107 77  2.139  0.0887
##   (pvalor x 2 = 0.1774)
##   31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.1538 0.113 77  1.363  0.3653
##   (pvalor x 2 = 0.7306)
##
## Concentracion = 75:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  0.3148 0.108 77  2.910  0.0130
##   (pvalor x 2 = 0.0260)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  0.2776 0.102 77  2.726  0.0214

```

```

(pvalor x 2 = 0.0428)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 -0.0372 0.102 77 -0.365 0.9292
(pvalor x 2 = 1.8584)
##
## Concentracion = 125:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.3130 0.101 77 -3.098 0.0076
(pvalor x 2 = 0.0152)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -0.1285 0.105 77 -1.228 0.4403
(pvalor x 2 = 0.8806)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 0.1845 0.105 77 1.763 0.1888
(pvalor x 2 = 0.3776)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

emm_bacteria <- emmeans(modelomixto, ~ Concentracion | Bacteria)
emm_bacteria

## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.563 0.134 2.36 0.0614 1.064
## 25 0.521 0.126 1.81 -0.0780 1.119
## 75 0.592 0.131 2.12 0.0586 1.126
## 125 0.225 0.128 1.94 -0.3416 0.792
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.427 0.128 1.95 -0.1387 0.992
## 25 0.447 0.131 2.14 -0.0845 0.978
## 75 0.277 0.131 2.12 -0.2562 0.811
## 125 0.538 0.128 1.94 -0.0286 1.104
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.408 0.128 1.94 -0.1588 0.974
## 25 0.293 0.134 2.36 -0.2084 0.794
## 75 0.315 0.126 1.81 -0.2840 0.913
## 125 0.353 0.131 2.12 -0.1800 0.887
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

tukey4 <- contrast(emm_bacteria, method = "pairwise", adjust = "tukey")
tukey4

## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 0.0420 0.1065 77.0 0.394
0.9791 (pvalor x 2 = 1.9582)
## Concentracion0 - Concentracion75 -0.0296 0.1124 77.0 -0.263
0.9936 (pvalor x 2 = 1.9872)
## Concentracion0 - Concentracion125 0.3376 0.1091 77.0 3.094

```

```

0.0143 (pvalor x 2 = 0.0286)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.0715 0.1020 77.0   -0.702
0.8962 (pvalor x 2 = 1.7924)
## Concentracion25 - Concentracion125    0.2956 0.0982 77.0    3.010
0.0182 (pvalor x 2 = 0.0364)
## Concentracion75 - Concentracion125    0.3671 0.1046 77.0    3.510
0.0041 (pvalor x 2 = 0.0082)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                                estimate      SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.0199 0.1057 77.1   -0.188
0.9976 (pvalor x 2 = 1.9952)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.1494 0.1049 77.0    1.423
0.4888 (pvalor x 2 = 0.9776)
## Concentracion0 - Concentracion125   -0.1113 0.1012 77.0   -1.100
0.6907 (pvalor x 2 = 1.3814)
## Concentracion25 - Concentracion75    0.1692 0.1082 77.0    1.564
0.4049 (pvalor x 2 = 0.8098)
## Concentracion25 - Concentracion125  -0.0914 0.1050 77.0   -0.870
0.8201 (pvalor x 2 = 1.6402)
## Concentracion75 - Concentracion125  -0.2606 0.1046 77.0   -2.492
0.0692 (pvalor x 2 = 0.1384)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                                estimate      SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25     0.1150 0.1091 77.0    1.054
0.7183 (pvalor x 2 = 1.4366)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.0932 0.0982 77.0    0.949
0.7784 (pvalor x 2 = 1.5568)
## Concentracion0 - Concentracion125    0.0543 0.1046 77.0    0.519
0.9543 (pvalor x 2 = 1.9086)
## Concentracion25 - Concentracion75   -0.0218 0.1065 77.0   -0.204
0.9969 (pvalor x 2 = 1.9938)
## Concentracion25 - Concentracion125  -0.0607 0.1124 77.0   -0.540
0.9490 (pvalor x 2 = 1.8980)
## Concentracion75 - Concentracion125  -0.0389 0.1020 77.0   -0.382
0.9809 (pvalor x 2 = 1.9618)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```

Tablas A13. Peso fresco de las plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMa, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

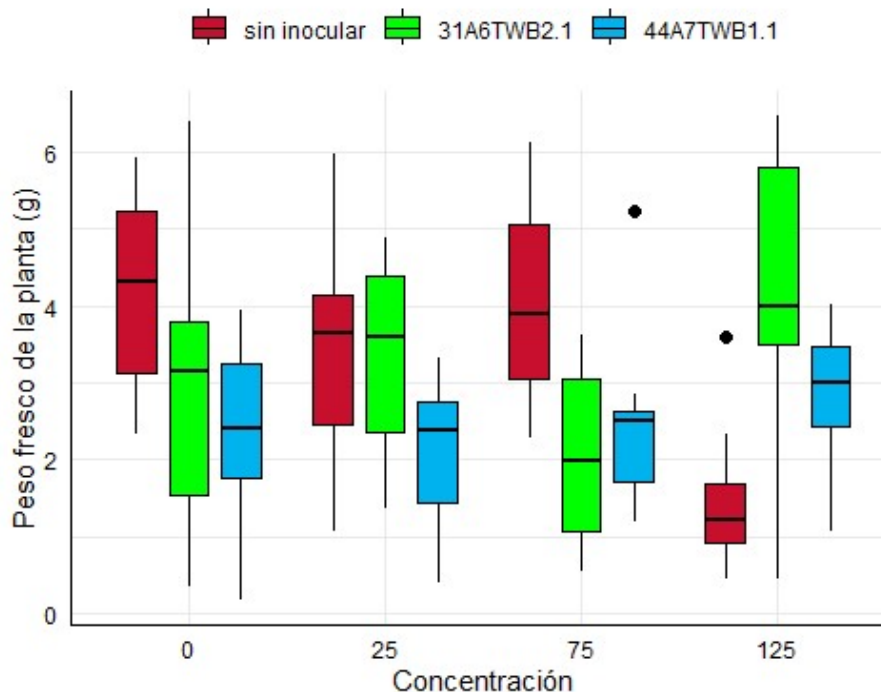
## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesofrescoplanta.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
mutate(Bacteria = case_when(
  Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
  Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
  Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
  TRUE ~ as.character(Bacteria)
))
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de
dato
```

Gráfico

```
library("ggplot2")
library(ggpubr)
ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Pesofresco, fill =
Bacteria)) +
geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color =
Bacteria),
colour = "black", lwd = 0.5) +
scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
labs(x = "Concentración",
y = "Peso fresco de la planta (g)") +
theme_minimal() +
theme(legend.position = "top",
legend.title = element_blank(),
axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
axis.text = element_text(colour = "black"),
axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```
modelo<-
lm(Pesofresco~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacte
```

```

ria, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Pesofresco ~ Concentracion + Bacteria + Semanacovariable
+
##      Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##              (Intercept)
Concentracion25              3.7203              -
0.6634
##              Concentracion75
Concentracion125             -0.1925              -
2.7375
##              Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1             -1.2589              -
1.8388
##              Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##              0.9994
1.1846
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##              -0.6444
3.9789
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##              0.3621
0.2046
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##              3.2662

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Chequeo de los supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.98899, p-value = 0.6197

library(car)

## Loading required package: carData

```

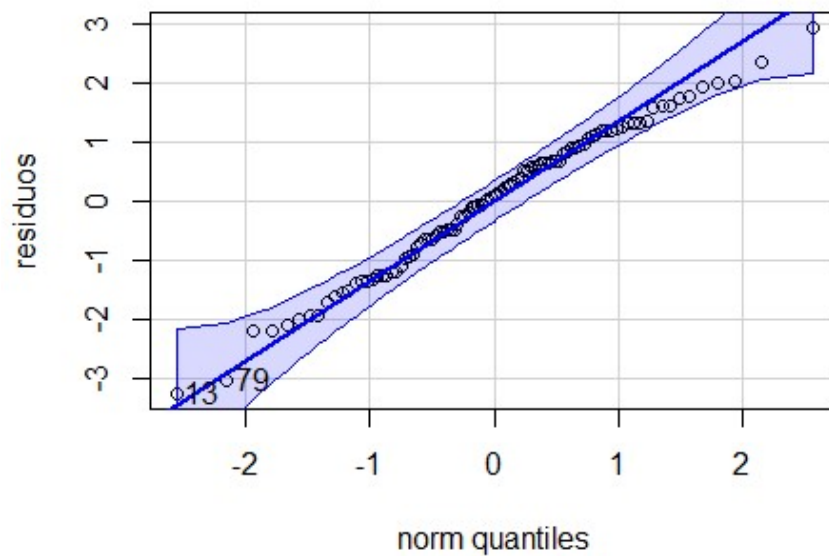
```
##
## Attaching package: 'car'

## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##   Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##   recode

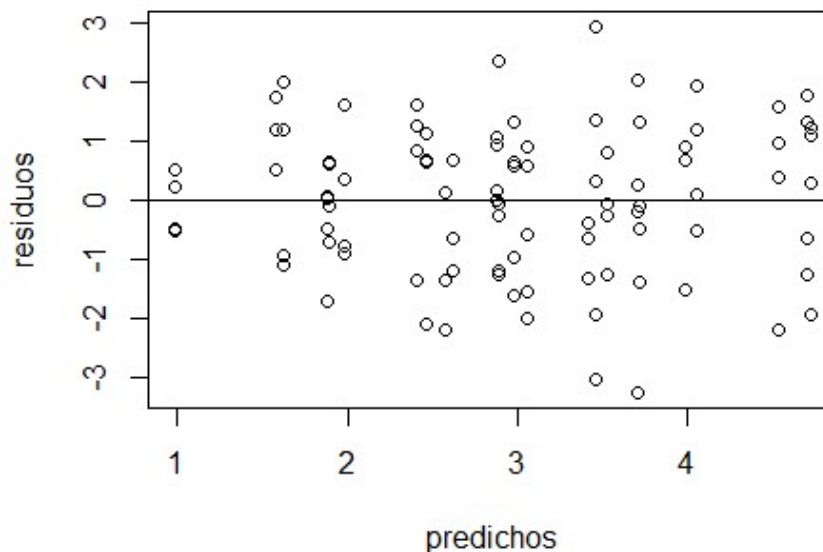
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##   some

qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 13 79

plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Pesofresco~Concentracion*Bacteria, data=datos, center = mean)
```

```
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11   0.809 0.6309
##      83
```

Anova

```
anova(modelo)
```

```
## Analysis of Variance Table
##
## Response: Pesofresco
##      Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
## Concentracion      3   2.185    0.7283    0.4106 0.7457787
## Bacteria            2  13.265    6.6323    3.7396 0.0279105 *
## Semanacovariable    1  23.071   23.0714   13.0087 0.0005314 ***
## Concentracion:Bacteria  6  55.886    9.3143    5.2519 0.0001276 ***
## Residuals          82 145.430    1.7735
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

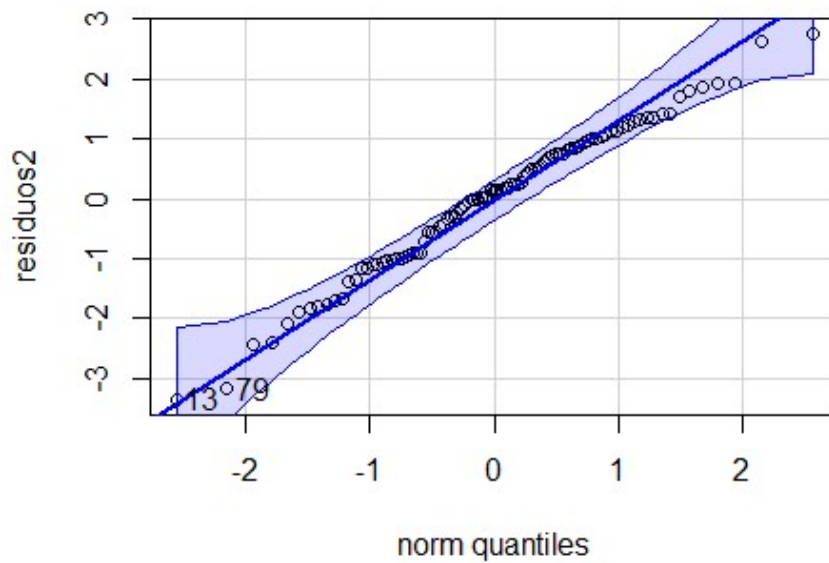
Modelo con la covariable

```
modelonuevocovariable<-
lm(Pesofresco~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacteria+Concentracion:Semanacovariable+Bacteria:Semanacovariable,
data=datos)
residuos2=modelonuevocovariable$residuals
predichos2=modelonuevocovariable$fitted.values
```

```
shapiro.test(residuos2)

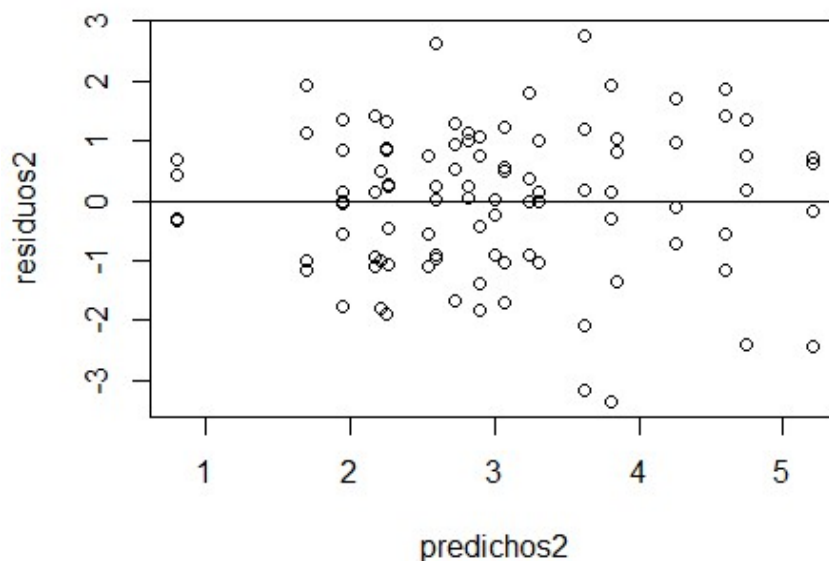
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98594, p-value = 0.4068

library(car)
qqPlot(residuos2)
```



```
## [1] 13 79

plot(predichos2, residuos2)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelonuevocovvariable)#forma alternativa a Levene

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.652).

anova(modelonuevocovvariable)

## Analysis of Variance Table
##
## Response: Pesofresco
##
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Concentracion	3	2.185	0.7283	0.4024	0.7516611
Bacteria	2	13.265	6.6323	3.6647	0.0301794 *
Semanacovvariable	1	23.071	23.0714	12.7481	0.0006179

Concentracion:Bacteria	6	55.886	9.3143	5.1466	0.0001709

Concentracion:Semanacovvariable	3	1.362	0.4540	0.2509	0.8604984
Bacteria:Semanacovvariable	2	4.714	2.3571	1.3024	0.2778002
Residuals	77	139.353	1.8098		
## ---					
## Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Agregando variable aleatoria (semanacovvariable como variable aleatoria)

```
library(lmerTest)

##
## Attaching package: 'lmerTest'
```

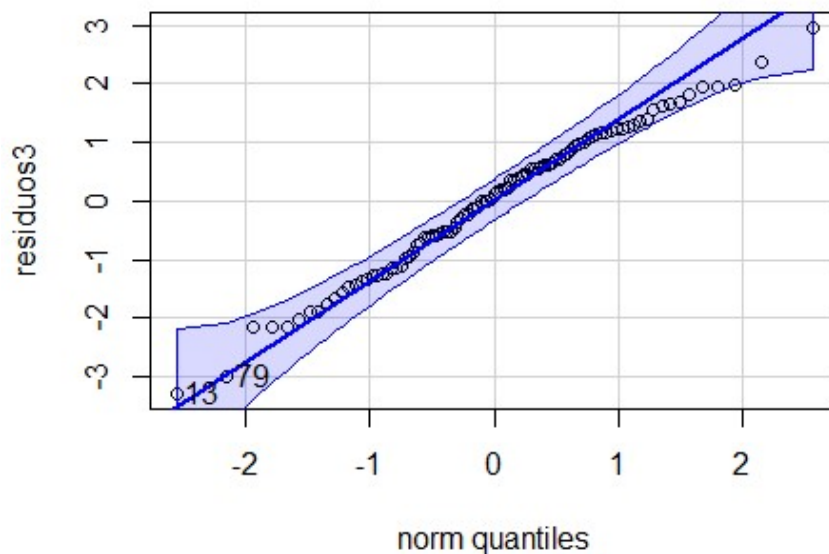
```
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmer

## The following object is masked from 'package:stats':
##
##      step

modelomixto <- lmer(Pesofresco ~ Concentracion * Bacteria + (1 |
Semanacovariable), data = datos)
residuos3 <- residuals(modelomixto)
predichos3 <- fitted(modelomixto)
shapiro.test(residuos2)

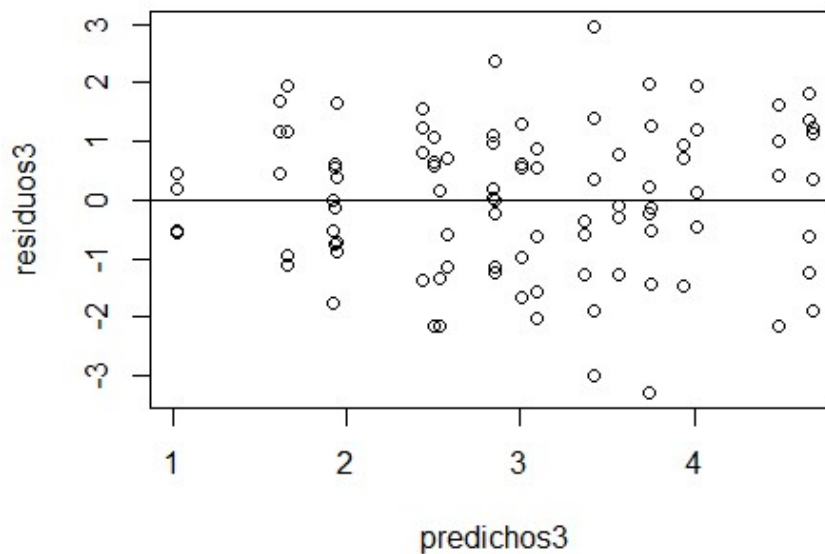
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.98594, p-value = 0.4068

library(car)
qqPlot(residuos3)
```



```
## [1] 13 79

plot(predichos3, residuos3)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelomixto)#forma alternativa a Levene

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.743).

library(lmerTest)
anova_result <- anova(modelomixto)
anova_result

## Type III Analysis of Variance Table with Satterthwaite's method
##
```

	Sum Sq	Mean Sq	NumDF	DenDF	F value	Pr(>F)
Concentracion	1.877	0.6257	3	82.014	0.3528	0.7872202
Bacteria	13.693	6.8464	2	82.004	3.8603	0.0249903 *
Concentracion:Bacteria	55.848	9.3080	6	82.013	5.2483	0.0001285 ***

```
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

library(emmeans)

emm_concentracion <- emmeans(modelomixto, ~ Bacteria | Concentracion)
emm_concentracion

## Concentracion = 0:
##
```

Bacteria	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
sin inocular	4.22	0.673	3.26	2.172	6.27
31A6TWB2.1	2.97	0.654	2.92	0.851	5.08
44A7TWB1.1	2.38	0.673	3.26	0.333	4.43

```
##
```

```

## Concentracion = 25:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular   3.55 0.654 2.92    1.438    5.67
##   31A6TWB2.1     3.47 0.674 3.27    1.426    5.52
##   44A7TWB1.1     2.08 0.726 4.38    0.132    4.03
##
## Concentracion = 75:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular   4.03 0.673 3.26    1.979    6.08
##   31A6TWB2.1     2.12 0.696 3.72    0.128    4.11
##   44A7TWB1.1     2.40 0.654 2.92    0.283    4.51
##
## Concentracion = 125:
##   Bacteria      emmean      SE    df lower.CL upper.CL
##   sin inocular   1.48 0.673 3.26   -0.566    3.53
##   31A6TWB2.1     4.20 0.673 3.26    2.154    6.25
##   44A7TWB1.1     2.90 0.696 3.72    0.914    4.90
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

tukey3 <- contrast(emm_concentracion, method = "pairwise", adjust =
"tukey")
tukey3

## Concentracion = 0:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  1.2547 0.647 82   1.938  0.1345
##   (pvalor x 2 = 0.2690)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  1.8388 0.666 82   2.761  0.0192
##   (pvalor x 2 = 0.0384)
##   31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.5841 0.647 82   0.902  0.6404
##   (pvalor x 2 = 1.2808)
##
## Concentracion = 25:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  0.0795 0.647 82   0.123  0.9917
##   (pvalor x 2 = 1.9834)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  1.4724 0.702 82   2.097  0.0967
##   (pvalor x 2 = 0.1934)
##   31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    1.3930 0.720 82   1.934  0.1356
##   (pvalor x 2 = 0.2712)
##
## Concentracion = 75:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
##   sin inocular - 31A6TWB2.1  1.9087 0.690 82   2.768  0.0189
##   (pvalor x 2 = 0.0378)
##   sin inocular - 44A7TWB1.1  1.6299 0.647 82   2.518  0.0363
##   (pvalor x 2 = 0.0726)
##   31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1   -0.2787 0.672 82  -0.415  0.9097
##   (pvalor x 2 = 1.8194)
##
## Concentracion = 125:
##   contrast              estimate      SE df t.ratio p.value

```

```
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -2.7200 0.666 82 -4.085 0.0003
(pvalor x 2 = 0.0006)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -1.4221 0.690 82 -2.062 0.1042
(pvalor x 2 = 0.2084)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 1.2979 0.690 82 1.882 0.1503
(pvalor x 2 = 0.3006)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

emm_bacteria <- emmeans(modelomixto, ~ Concentracion | Bacteria)
emm_bacteria

## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 4.22 0.673 3.26 2.172 6.27
## 25 3.55 0.654 2.92 1.438 5.67
## 75 4.03 0.673 3.26 1.979 6.08
## 125 1.48 0.673 3.26 -0.566 3.53
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 2.97 0.654 2.92 0.851 5.08
## 25 3.47 0.674 3.27 1.426 5.52
## 75 2.12 0.696 3.72 0.128 4.11
## 125 4.20 0.673 3.26 2.154 6.25
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 2.38 0.673 3.26 0.333 4.43
## 25 2.08 0.726 4.38 0.132 4.03
## 75 2.40 0.654 2.92 0.283 4.51
## 125 2.90 0.696 3.72 0.914 4.90
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## Confidence level used: 0.95

tukey4 <- contrast(emm_bacteria, method = "pairwise", adjust = "tukey")
tukey4

## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 0.6676 0.647 82.0 1.031
0.7317 (pvalor x 2 = 1.4634)
## Concentracion0 - Concentracion75 0.1925 0.666 82.0 0.289
0.9915 (pvalor x 2 = 1.9830)
## Concentracion0 - Concentracion125 2.7375 0.666 82.0 4.111
0.0005 (pvalor x 2 = 0.0010)
## Concentracion25 - Concentracion75 -0.4751 0.647 82.0 -0.734
0.8832 (pvalor x 2 = 1.7664)
## Concentracion25 - Concentracion125 2.0699 0.647 82.0 3.198
0.0104 (pvalor x 2 = 0.0208)
## Concentracion75 - Concentracion125 2.5450 0.666 82.0 3.822
0.0014 (pvalor x 2 = 0.0208)
```

```

##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                estimate    SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.5076 0.649 82.1  -0.782
0.8626 (pvalor x 2 = 1.7252)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.8465 0.672 82.0   1.259
0.5913 (pvalor x 2 = 1.1826)
## Concentracion0 - Concentracion125    -1.2372 0.647 82.0  -1.911
0.2314 (pvalor x 2 = 0.4628)
## Concentracion25 - Concentracion75     1.3541 0.689 82.0   1.964
0.2101 (pvalor x 2 = 0.4202)
## Concentracion25 - Concentracion125    -0.7295 0.667 82.0  -1.094
0.6943 (pvalor x 2 = 1.3886)
## Concentracion75 - Concentracion125    -2.0837 0.690 82.0  -3.022
0.0173 (pvalor x 2 = 0.0346)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                estimate    SE    df t.ratio
p.value
## Concentracion0 - Concentracion25     0.3013 0.719 82.0   0.419
0.9751 (pvalor x 2 = 1.9502)
## Concentracion0 - Concentracion75    -0.0163 0.647 82.0  -0.025
1.0000 (pvalor x 2 = 2.0000)
## Concentracion0 - Concentracion125    -0.5233 0.690 82.0  -0.759
0.8726 (pvalor x 2 = 1.7452)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.3176 0.702 82.0  -0.452
0.9690 (pvalor x 2 = 1.9380)
## Concentracion25 - Concentracion125    -0.8246 0.741 82.0  -1.112
0.6830 (pvalor x 2 = 1.3660)
## Concentracion75 - Concentracion125    -0.5070 0.672 82.0  -0.754
0.8746 (pvalor x 2 = 1.7492)
##
## Degrees-of-freedom method: kenward-roger
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```

Tablas A14. Peso seco de las plantas de *Festuca arundinacea* inoculada con actinobacterias a diferentes concentraciones de cobre

Carga de librerías para rmarkdown

```
pacman::p_load(#rio,
  lubridate,
  #nasapower,
  janitor,
  tidyverse,
  skimr,
  #see,
  #GGally,
  #correlation,
  ggcorrplot,
  viridis,
  performance,
  ggeffects,
  emmeans,
  multcomp,
  glmmTMB,
  MASS,
  lme4,
  multcompView,
  DHARMa, #para GLMM-inflados en ceros
  texreg,
  DescTools,
  agricolae,
  TH.data,
  mvtnorm,
  survival,
  lsmeans,
  dplyr,
  cars
)

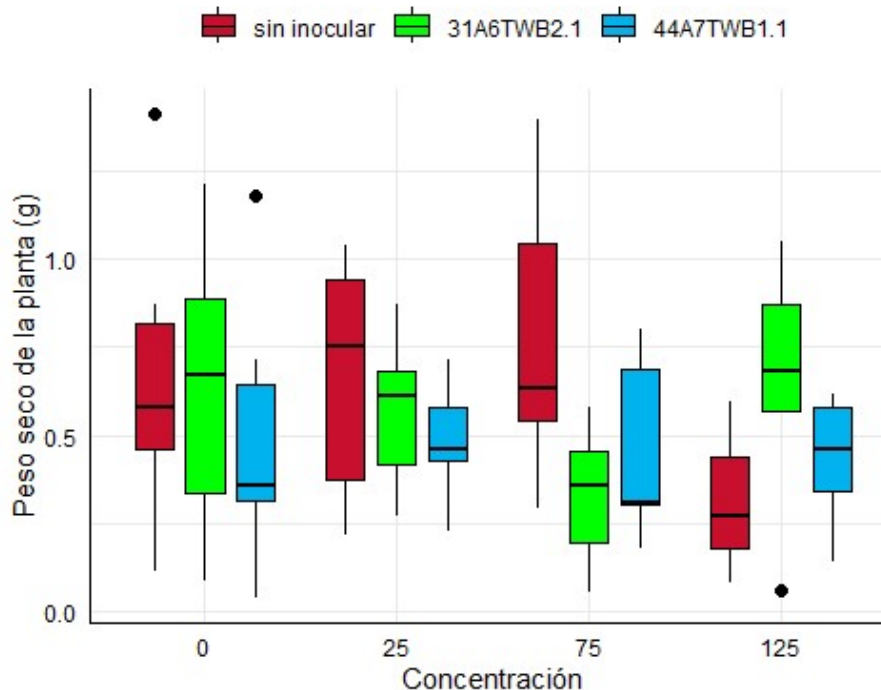
## Installing package into 'C:/Users/aiel/AppData/Local/R/win-
library/4.3'
## (as 'lib' is unspecified)

setwd("C:/Users/aiel/Documents/1AATramites facultad/becas/BECA
UBACYT2022/Estadistica/Festuca/Exceles de los experimentos depurados para
trabajar en Rstudio")
library(readxl)
datos <- read_excel("Pesosecoplanta.xlsx")
library(dplyr)
datos <- datos %>%
mutate(Bacteria = case_when(
  Bacteria == 0 ~ "sin inocular",
  Bacteria == 1 ~ "31A6TWB2.1",
  Bacteria == 2 ~ "44A7TWB1.1",
  TRUE ~ as.character(Bacteria)
))
datos$Bacteria <- factor(datos$Bacteria, levels = c("sin inocular",
```

```
"31A6TWB2.1", "44A7TWB1.1"))
datos$Concentracion=as.factor(datos$Concentracion) #convertir el tipo de dato
```

Gráfico

```
library("ggplot2")
library(ggpubr)
ggplot(datos, aes(x = Concentracion, y = Pesoseco, fill = Bacteria)) +
geom_boxplot(position = position_dodge(width = 0.8), width = 0.6,
outlier.shape = 16, outlier.size = 2, aes(color = Bacteria),
colour = "black", lwd = 0.5) +
scale_fill_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE")) +
scale_color_manual(values = c("sin inocular" = "#C8102E",
"31A6TWB2.1" = "#00FF00", "44A7TWB1.1" = "#00B2EE"), guide = "none") +
labs(x = "Concentración",
y = "Peso seco de la planta (g)") +
theme_minimal() +
theme(legend.position = "top",
legend.title = element_blank(),
axis.line = element_line(size = 0.5, colour = "black"),
axis.text = element_text(colour = "black"),
axis.title = element_text(colour = "black"))
```



Modelo

```
modelo<-
lm(Pesoseco~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacteri
```

```

a, data=datos)
modelo

##
## Call:
## lm(formula = Pesoseco ~ Concentracion + Bacteria + Semanacovariable +
##     Concentracion:Bacteria, data = datos)
##
## Coefficients:
##                (Intercept)
Concentracion25                0.51798
0.03629
##                Concentracion75
Concentracion125                0.12089
0.33938
##                Bacteria31A6TWB2.1
Bacteria44A7TWB1.1            -0.04213
0.12934
##                Semanacovariableb
Concentracion25:Bacteria31A6TWB2.1
##                0.25556
0.02069
## Concentracion75:Bacteria31A6TWB2.1
Concentracion125:Bacteria31A6TWB2.1
##                -0.37726
0.44103
## Concentracion25:Bacteria44A7TWB1.1
Concentracion75:Bacteria44A7TWB1.1
##                -0.04539
0.20666
## Concentracion125:Bacteria44A7TWB1.1
##                0.27824

residuos=modelo$residuals
predichos=modelo$fitted.values

```

Chequeo de los supuestos

```

shapiro.test(residuos)

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos
## W = 0.99425, p-value = 0.9683

library(car)

## Loading required package: carData

##
## Attaching package: 'car'

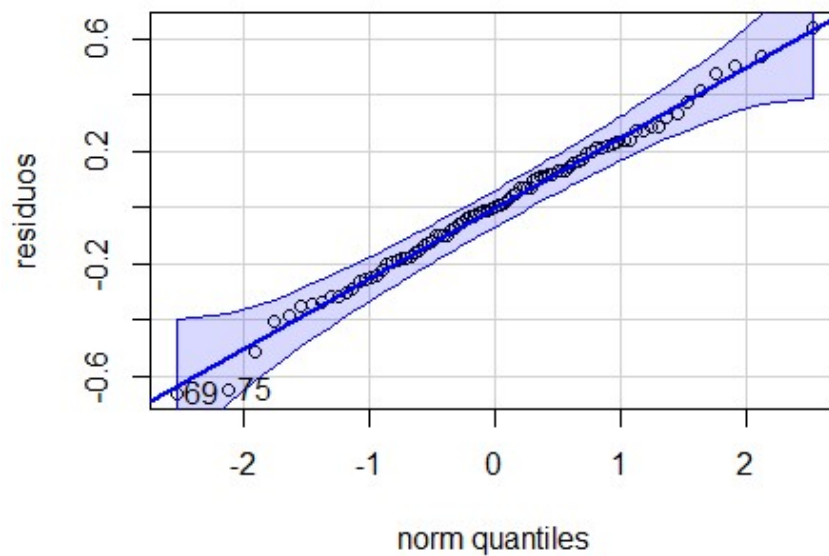
```

```
## The following object is masked from 'package:DescTools':
##
##      Recode

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      recode

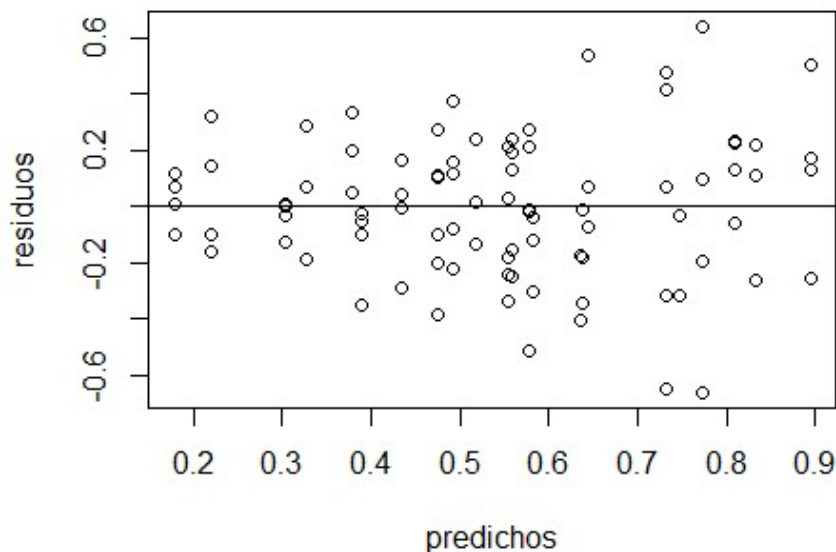
## The following object is masked from 'package:purrr':
##
##      some

qqPlot(residuos)
```



```
## [1] 69 75

plot(predichos, residuos)
abline(0,0)
```



```
leveneTest(Pesoseco~Concentracion*Bacteria, data=datos, center = mean)

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = mean)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11    1.65 0.1015
##      77

library(performance)
check_homogeneity(modelo)

## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
## (Bartlett Test, p = 0.317).
```

Modelado de la varianza

```
library(nlme)

##
## Attaching package: 'nlme'

## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmList

## The following object is masked from 'package:dplyr':
##
##      collapse

modelo_Varident <- gls(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1 |
  Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent<-resid(modelo_Varident, type = "pearson")
```

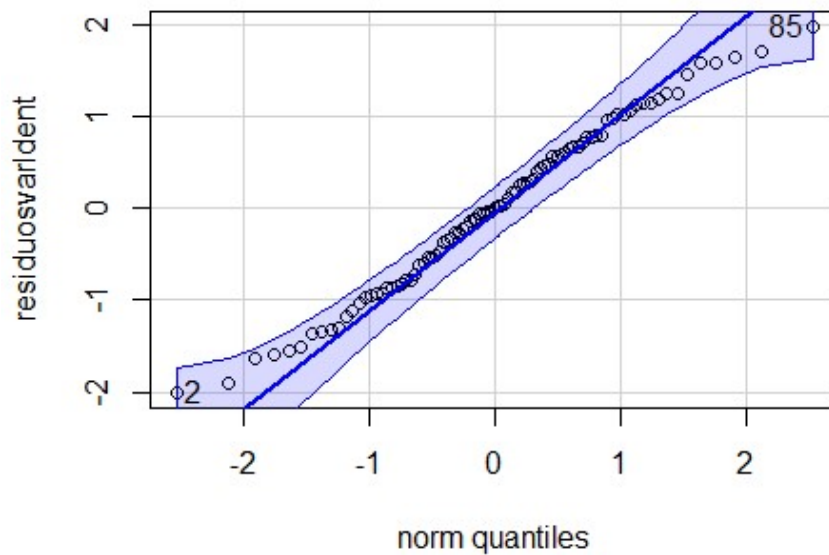
```

predichosvarIdent<-fitted(modelo_Varident)
shapiro.test(residuosvarIdent)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent
## W = 0.98663, p-value = 0.4984

library(car)
qqPlot(residuosvarIdent)

```

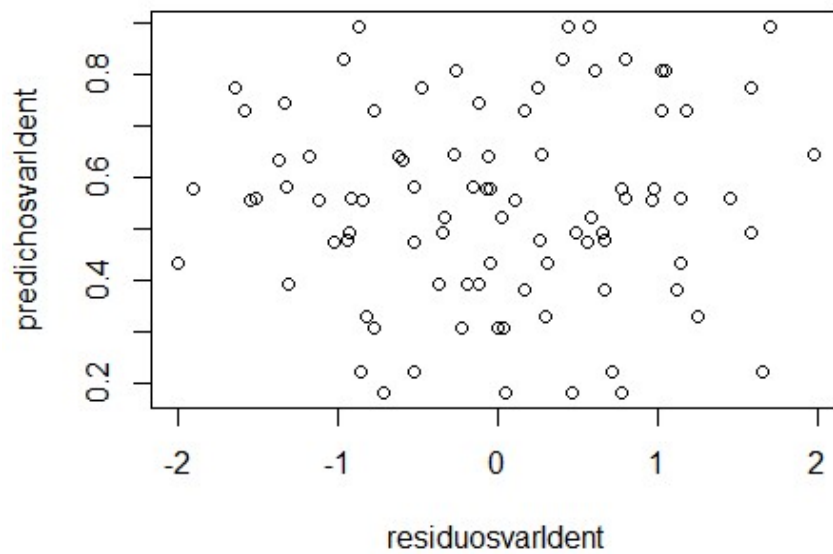


```

## [1] 2 85

plot(residuosvarIdent,predichosvarIdent)
abline(0,0)

```



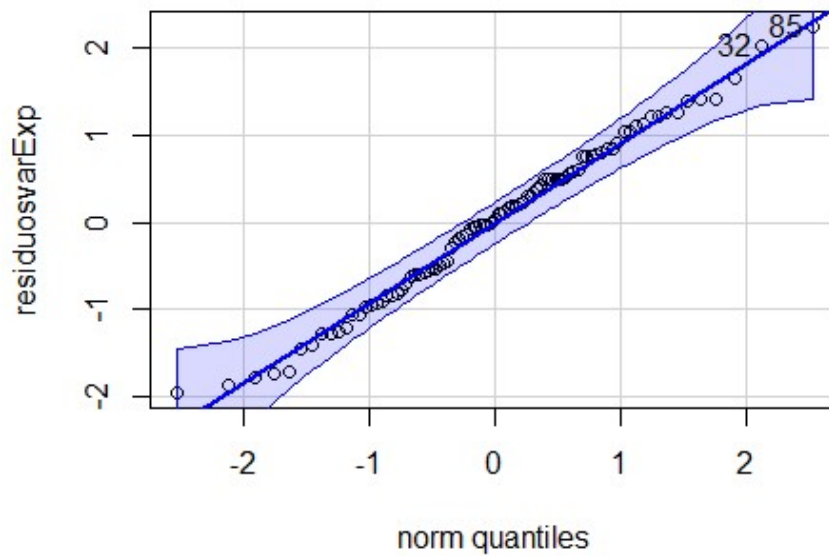
```

modelo_VarExp <- gls( Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable, data = datos, weights = varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp<-resid(modelo_VarExp, type = "pearson")
predichosvarExp<-fitted(modelo_VarExp)
shapiro.test(residuosvarExp)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp
## W = 0.98979, p-value = 0.7227

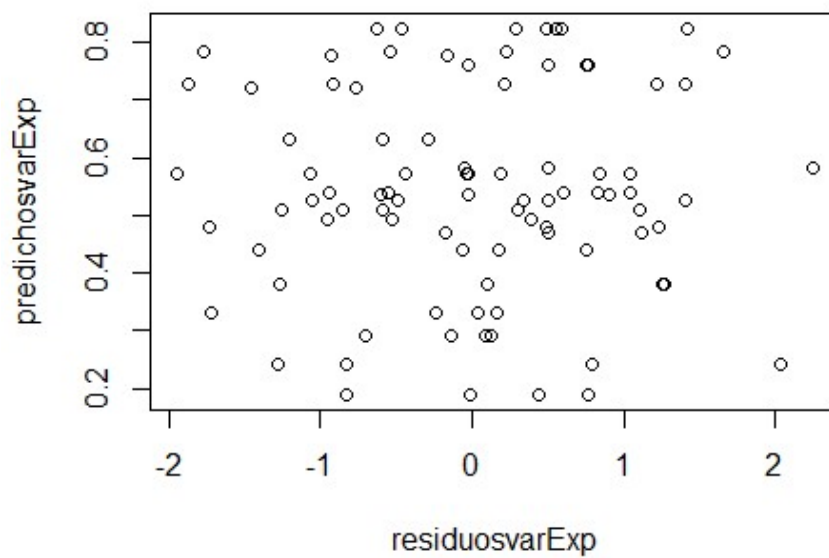
library(car)
qqPlot(residuosvarExp)

```



```
## [1] 85 32
```

```
plot(residuosvarExp, predichosvarExp)
abline(0,0)
```

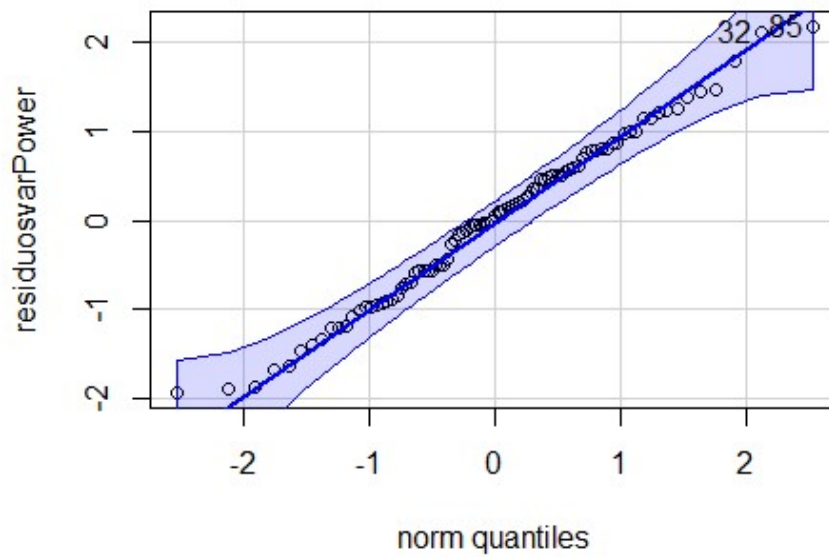


```
modelo_varPower <- gls(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovvariable, data = datos, weights = varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower<-resid(modelo_varPower, type = "pearson")
```

```
predichosvarPower<-fitted(modelo_varPower)
shapiro.test(residuosvarPower)
```

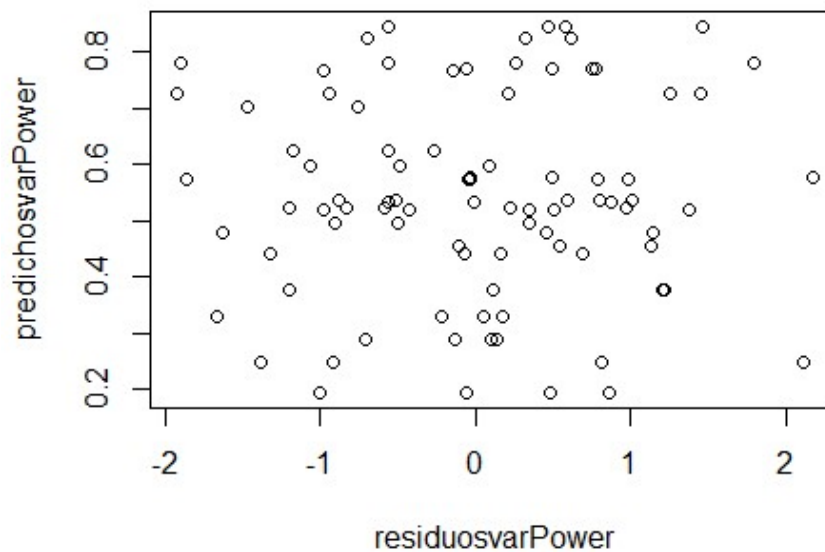
```
##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower
## W = 0.98945, p-value = 0.6979
```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarPower)
```



```
## [1] 85 32
```

```
plot(residuosvarPower,predichosvarPower)
abline(0,0)
```



```
AIC(modelo_Varident, modelo_VarExp, modelo_varPower)
```

```
##           df      AIC
## modelo_Varident 25 78.98554
## modelo_VarExp   15 61.47347
## modelo_varPower 15 61.70872
```

Anova

```
Anova(modelo_VarExp)
```

```
## Analysis of Deviance Table (Type II tests)
##
## Response: Pesoseco
##           Df    Chisq Pr(>Chisq)
## Concentracion      3 10.9195  0.012169 *
## Bacteria            2  0.9383  0.625532
## Semanacovariable    1 21.5110 3.518e-06 ***
## Concentracion:Bacteria 6 19.4513  0.003466 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Modelo con covariable

```
modelonuevocovariable<-
lm(Pesoseco~Concentracion+Bacteria+Semanacovariable+Concentracion:Bacteri
a+Concentracion:Semanacovariable +Bacteria:Semanacovariable, data=datos)
residuos2=modelonuevocovariable$residuals
predichos2=modelonuevocovariable$fitted.values
predichos2
```

```

##      1      2      3      4      5      6      7
8
## 0.1606596 0.4521048 0.4521048 0.1606596 0.4521048 0.1606596 0.1606596
0.4521048
##      9     10     11     12     13     14     15
16
## 0.7321354 0.7321354 0.6380567 0.6380567 0.6380567 0.6380567 0.7321354
0.6380567
##     17     18     19     20     21     22     23
24
## 0.4950693 0.3935059 0.3935059 0.4950693 0.3935059 0.3935059 0.4950693
0.5118560
##     25     26     27     28     29     30     31
32
## 0.9896910 0.9896910 0.5118560 0.9896910 0.5118560 0.9896910 0.4892713
0.2088028
##     33     34     35     36     37     38     39
40
## 0.2088028 0.2088028 0.2088028 0.4892713 0.4892713 0.2848754 0.2848754
0.5728286
##     41     42     43     44     45     46     47
48
## 0.5728286 0.5728286 0.2848754 0.5728286 0.2848754 0.5728286 0.8214621
0.8214621
##     49     50     51     52     53     54     55
56
## 0.5449633 0.5449633 0.5449633 0.5449633 0.5449633 0.8214621 0.8214621
0.5418590
##     57     58     59     60     61     62     63
64
## 0.5418590 0.5418590 0.5418590 0.5418590 0.6209913 0.6209913 0.4471139
0.5337310
##     65     66     67     68     69     70     71
72
## 0.5337310 0.4471139 0.4471139 0.3991250 0.8626772 0.8626772 0.3991250
0.3991250
##     73     74     75     76     77     78     79
80
## 0.8626772 0.8626772 0.7353912 0.7353912 0.4692055 0.7353912 0.7353912
0.4692055
##     81     82     83     84     85     86     87
88
## 0.4692055 0.7353912 0.3808778 0.6545482 0.6545482 0.3808778 0.3808778
0.3808778
##      89
## 0.6545482

```

Chequeo supuestos de modelo con covariable

```
shapiro.test(residuos2)
```

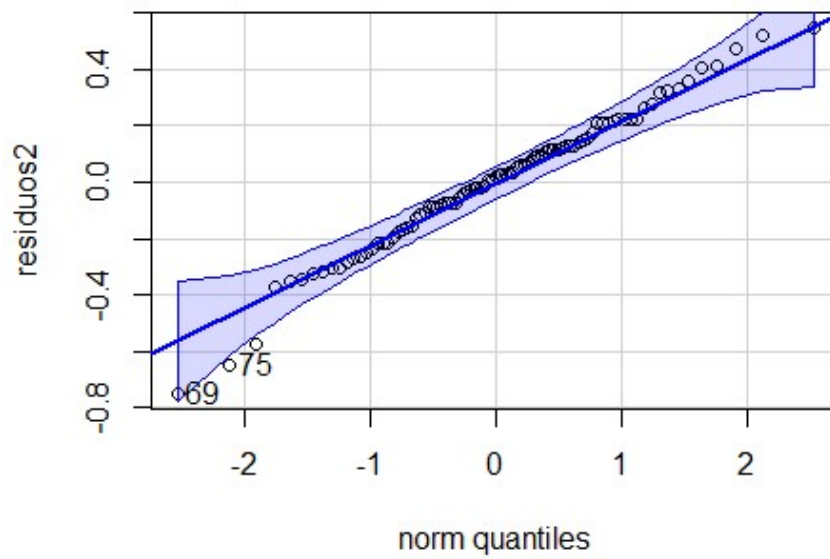
```

##
## Shapiro-Wilk normality test
##

```

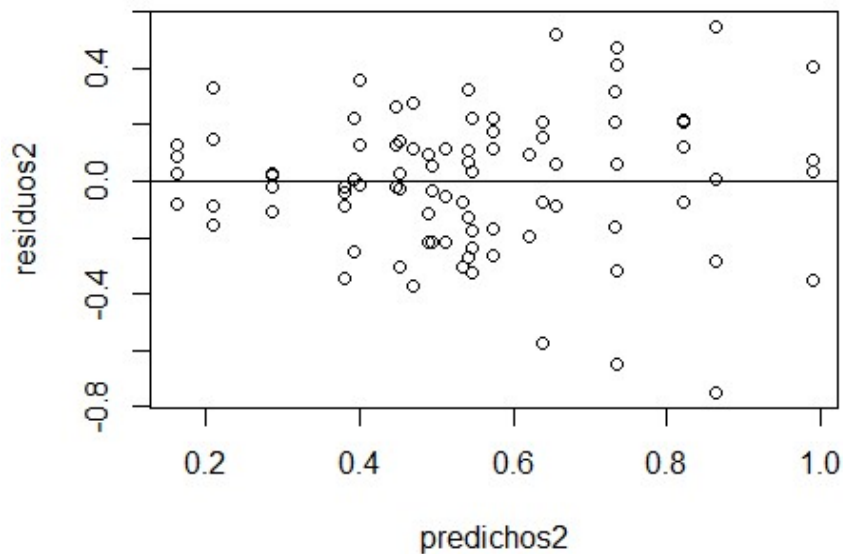
```
## data:  residuos2
## W = 0.9849, p-value = 0.3928

library(car)
qqPlot(residuos2)
```



```
## [1] 69 75

plot(predichos2, residuos2)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelonuevocovvariable)
```

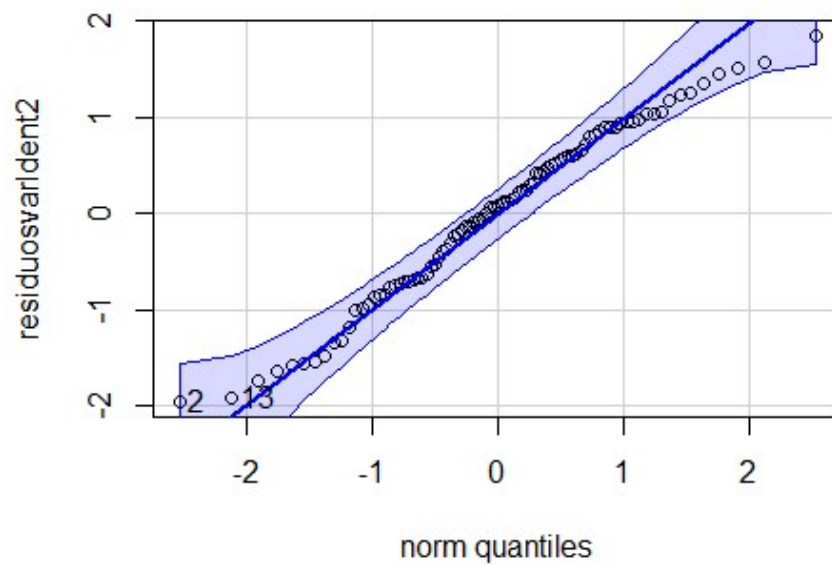
```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups
(Bartlett Test, p = 0.317).
```

Modelado de varianza de modelo con covariable

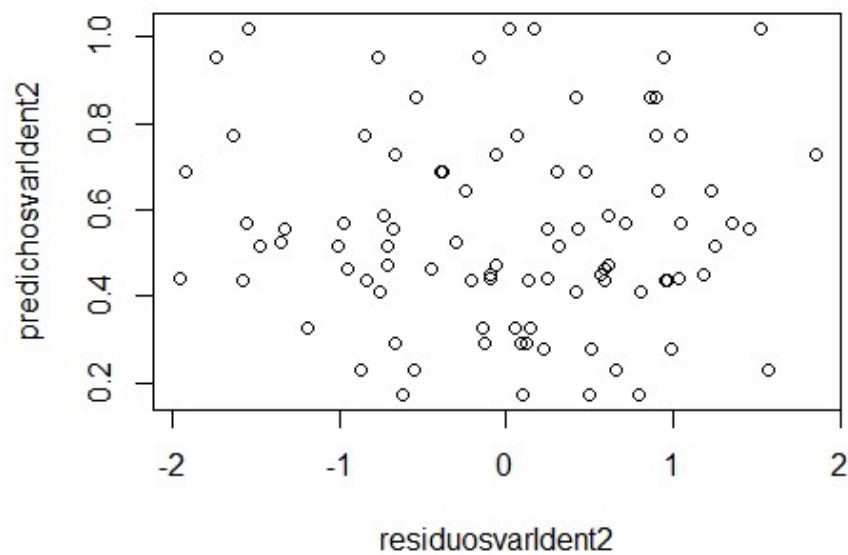
```
library(nlme)
modelo_Varident2 <- gls(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights = varIdent(form = ~ 1
| Concentracion * Bacteria))
residuosvarIdent2<-resid(modelo_Varident2, type = "pearson")
predichosvarIdent2<-fitted(modelo_Varident2)
shapiro.test(residuosvarIdent2)
```

```
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarIdent2
## W = 0.98039, p-value = 0.198
```

```
library(car)
qqPlot(residuosvarIdent2)
```



```
## [1] 2 13
plot(residuosvarIdent2, predichosvarIdent2)
abline(0,0)
```



```
modelo_VarExp2 <- gls( Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights =
```

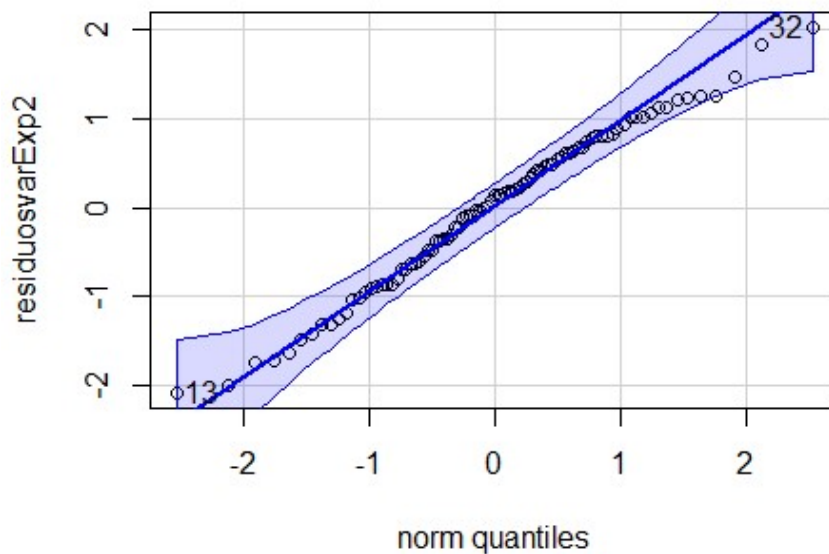
```

varExp(form=~fitted(.)))
residuosvarExp2<-resid(modelo_VarExp2, type = "pearson")
predichosvarExp2<-fitted(modelo_VarExp2)
shapiro.test(residuosvarExp2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarExp2
## W = 0.98612, p-value = 0.4653

library(car)
qqPlot(residuosvarExp2)

```

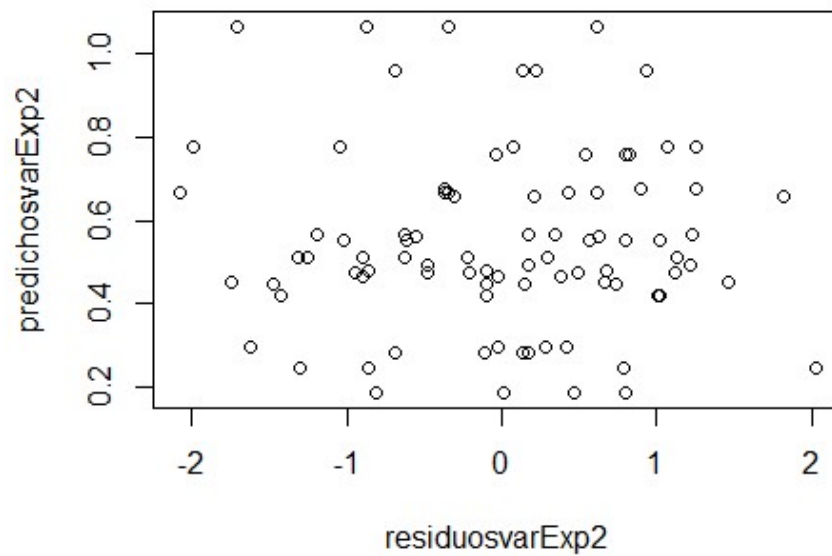


```

## [1] 13 32

plot(residuosvarExp2,predichosvarExp2)
abline(0,0)

```



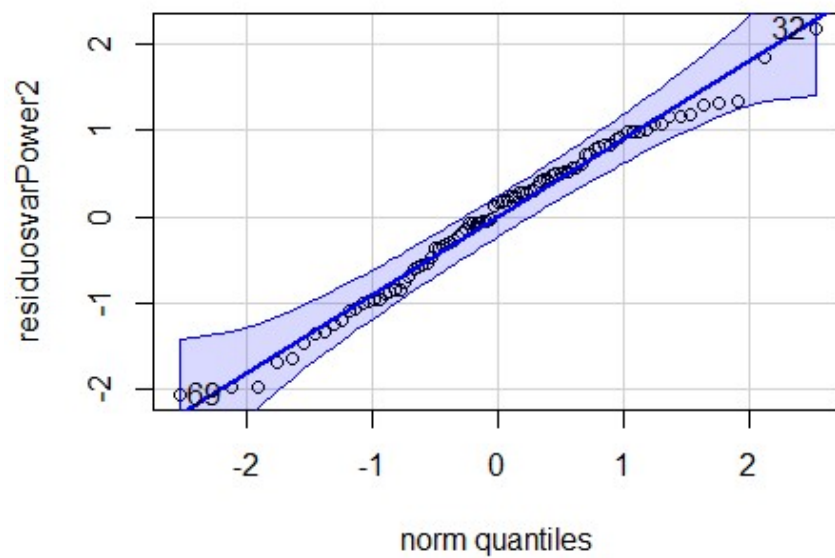
```

modelo_varPower2 <- gls( Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria +
  Semanacovariable+Concentracion:Semanacovariable
+Bacteria:Semanacovariable, data = datos, weights =
varPower(form=~fitted(.)))
residuosvarPower2<-resid(modelo_varPower2, type = "pearson")
predichosvarPower2<-fitted(modelo_varPower2)
shapiro.test(residuosvarPower2)

##
##  Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuosvarPower2
## W = 0.98498, p-value = 0.3973

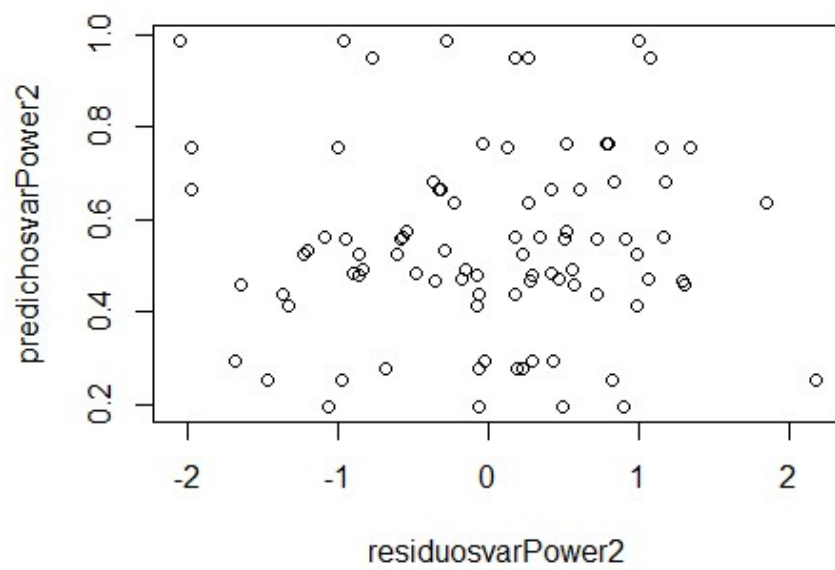
library(car)
qqPlot(residuosvarPower2)

```



```
## [1] 32 69
```

```
plot(residuosvarPower2, predichosvarPower2)
abline(0,0)
```



```
AIC(modelo_Varident2, modelo_VarExp2, modelo_varPower2)
```

```
##           df      AIC
## modelo_Varident2 30 91.95847
## modelo_VarExp2   20 72.95729
## modelo_varPower2 20 74.12247
```

Anova nuevo modelo con covariable y varianza modelada

```
anova(modelo_VarExp2)
```

```
## Denom. DF: 71
##
##           numDF  F-value p-value
## (Intercept)      1 349.7723 <.0001
## Concentracion     3   2.8852  0.0416
## Bacteria          2   0.7206  0.4900
## Semanacovariable  1 20.0237 <.0001
## Concentracion:Bacteria  6   3.3534  0.0058
## Concentracion:Semanacovariable  3   1.2997  0.2813
## Bacteria:Semanacovariable  2   1.8923  0.1582
```

Agregando variable aleatoria (semanacovariable como variable aleatoria)

```
library(lmerTest)
```

```
##
## Attaching package: 'lmerTest'

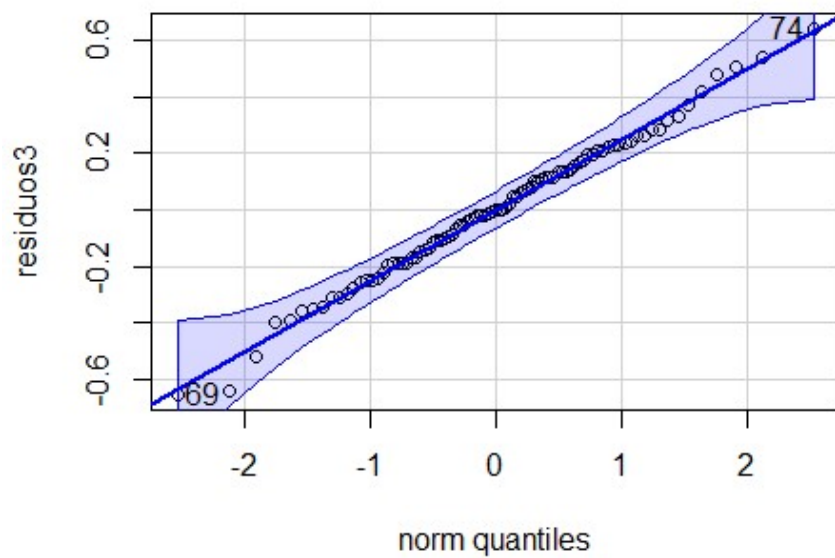
## The following object is masked from 'package:lme4':
##
##      lmer

## The following object is masked from 'package:stats':
##
##      step

modelomixto <- lmer(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria + (1 |
Semanacovariable), data = datos)
residuos3 <- residuals(modelomixto)
predichos3 <- fitted(modelomixto)
shapiro.test(residuos2)

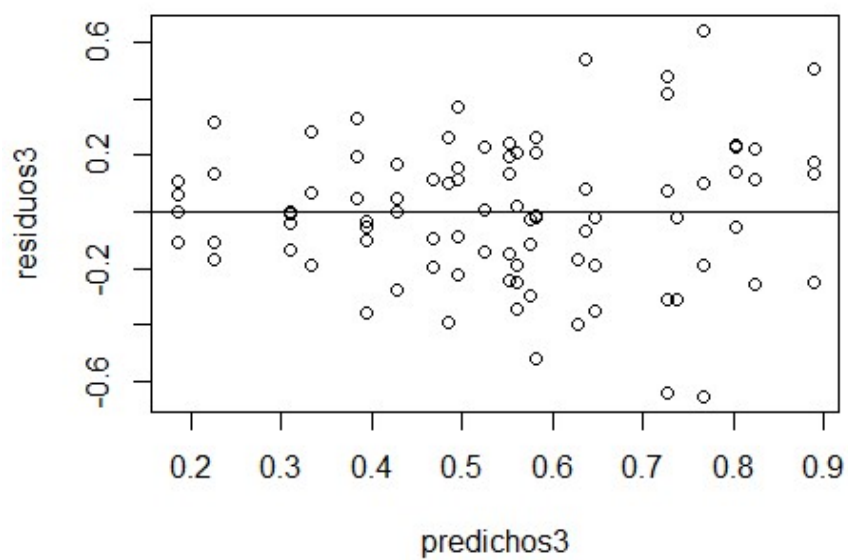
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos2
## W = 0.9849, p-value = 0.3928

library(car)
qqPlot(residuos3)
```



```
## [1] 69 74
```

```
plot(predichos3, residuos3)
abline(0,0)
```



```
library(performance)
check_homogeneity(modelomixto)#forma alternativa a Levene
```

```
## OK: There is not clear evidence for different variances across groups  
(Bartlett Test, p = 0.183).
```

```
library(nlme)
```

```
# Cargar Librerías
```

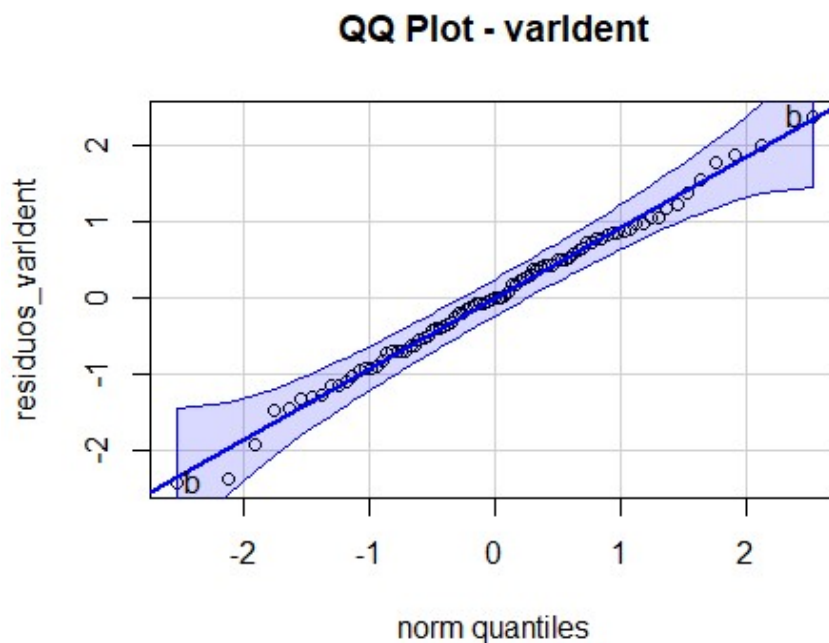
```
library(nlme)
```

```
# Ajuste del modelo con varIdent
```

```
model_varIdent <- lme(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria,  
  random = ~ 1 | Semanacovariable,  
  data = datos,  
  weights = varIdent())  
residuos_varIdent <- resid(model_varIdent, type = "pearson")  
predichos_varIdent <- fitted(model_varIdent)  
shapiro_test_varIdent <- shapiro.test(residuos_varIdent)  
shapiro_test_varIdent
```

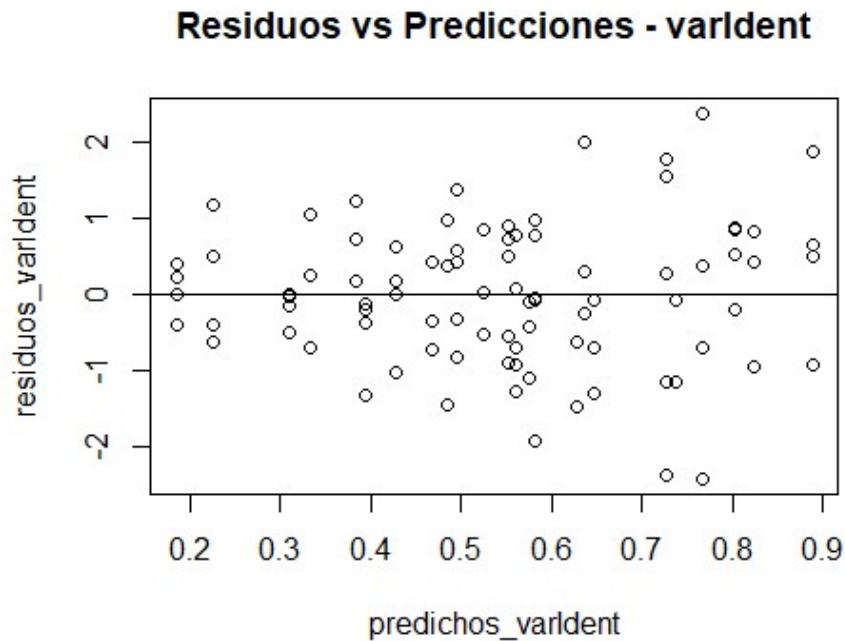
```
##  
## Shapiro-Wilk normality test  
##  
## data:  residuos_varIdent  
## W = 0.99393, p-value = 0.9586
```

```
qqPlot(residuos_varIdent, main = "QQ Plot - varIdent")
```



```
## b b  
## 69 74
```

```
plot(predichos_varIdent, residuos_varIdent, main = "Residuos vs
Predicciones - varIdent")
abline(0, 0)
```



```
levene_test_varIdent <- leveneTest(residuos_varIdent ~
datos$Concentracion * datos$Bacteria)
levene_test_varIdent

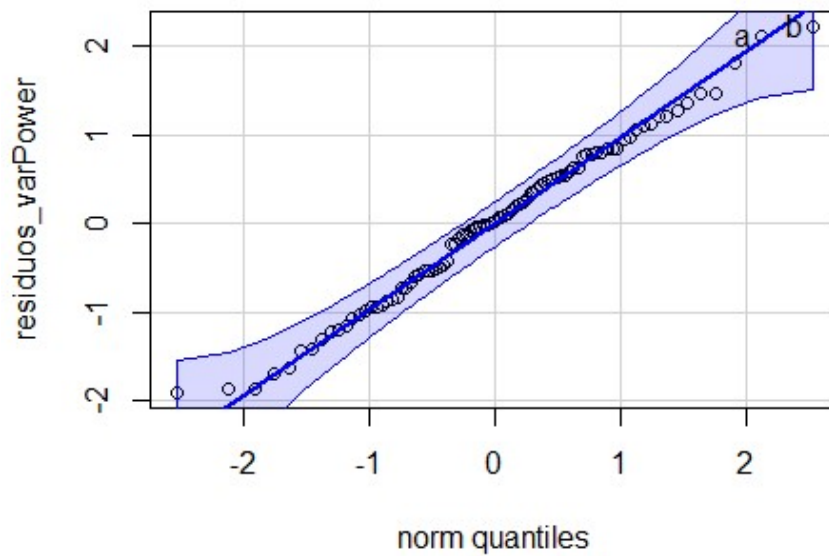
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  1.0781 0.3898
##      77

# Ajuste del modelo con varPower
model_varPower <- lme(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria,
                      random = ~ 1 | Semanacovariable,
                      data= datos,
                      weights = varPower())
residuos_varPower <- resid(model_varPower, type = "pearson")
predichos_varPower <- fitted(model_varPower)
shapiro_test_varPower <- shapiro.test(residuos_varPower)
shapiro_test_varPower

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos_varPower
## W = 0.98975, p-value = 0.7198

qqPlot(residuos_varPower, main = "QQ Plot - varPower")
```

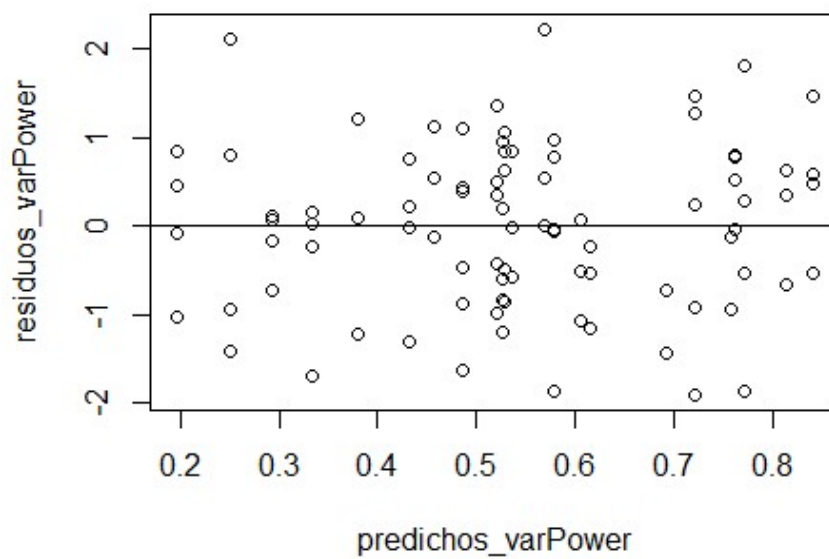
QQ Plot - varPower



```
## b a
## 85 32

plot(predichos_varPower, residuos_varPower, main = "Residuos vs
Predicciones - varPower")
abline(0, 0)
```

Residuos vs Predicciones - varPower



```

levene_test_varPower <- leveneTest(residuos_varPower ~
datos$Concentracion * datos$Bacteria)
levene_test_varPower

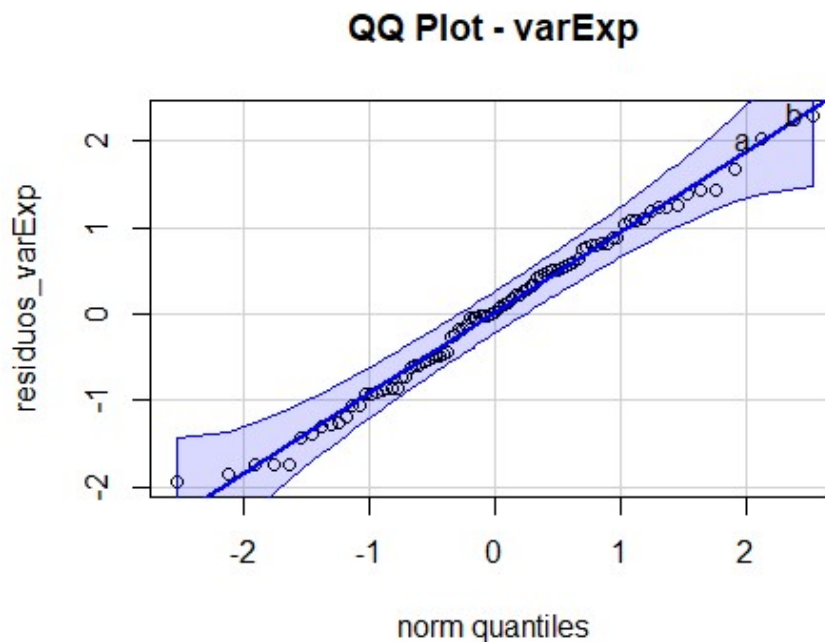
## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  0.4736 0.9141
##      77

# Ajuste del modelo con varExp
model_varExp <- lme(Pesoseco ~ Concentracion * Bacteria,
  random = ~ 1 | Semanacovariable,
  data = datos,
  weights = varExp())
residuos_varExp <- resid(model_varExp, type = "pearson")
predichos_varExp <- fitted(model_varExp)
shapiro_test_varExp <- shapiro.test(residuos_varExp)
shapiro_test_varExp

##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  residuos_varExp
## W = 0.99004, p-value = 0.7402

qqPlot(residuos_varExp, main = "QQ Plot - varExp")

```

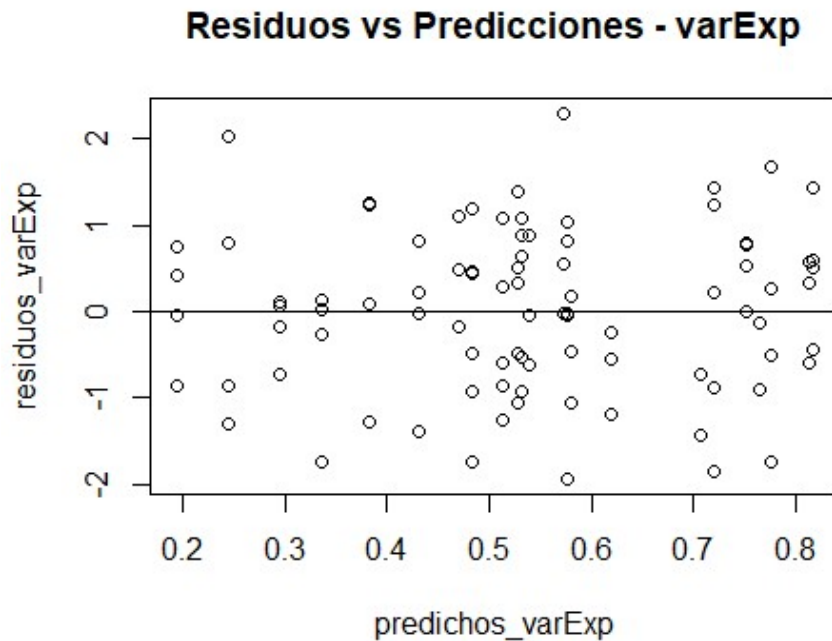


```

## b a
## 85 32

```

```
plot(predichos_varExp, residuos_varExp, main = "Residuos vs Predicciones
- varExp")
abline(0, 0)
```



```
levene_test_varExp <- leveneTest(residuos_varExp ~ datos$Concentracion *
datos$Bacteria)
levene_test_varExp

## Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
##      Df F value Pr(>F)
## group 11  0.4411 0.9324
##      77

# Comparar modelos usando AIC
aic_values <- AIC(model_varIdent, model_varPower, model_varExp)
print(aic_values)

##              df      AIC
## model_varIdent 14 71.76547
## model_varPower 15 61.73632
## model_varExp   15 61.49650

library(lmerTest)
anova_result <- anova(model_varExp)
anova_result

##              numDF denDF   F-value p-value
## (Intercept)      1    76 14.957636 0.0002
## Concentracion     3    76  3.672030 0.0158
## Bacteria          2    76  0.441327 0.6448
## Concentracion:Bacteria 6    76  3.231864 0.0070
```

```
library(emmeans)

emm_concentracion <- emmeans(model_varExp, ~ Bacteria | Concentracion)
emm_concentracion

## Concentracion = 0:
## Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.658 0.167  1   -1.46    2.78
## 31A6TWB2.1    0.602 0.157  1   -1.39    2.60
## 44A7TWB1.1    0.454 0.143  1   -1.37    2.28
##
## Concentracion = 25:
## Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.633 0.153  1   -1.31    2.57
## 31A6TWB2.1    0.647 0.159  1   -1.37    2.67
## 44A7TWB1.1    0.589 0.166  1   -1.52    2.69
##
## Concentracion = 75:
## Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.698 0.173  1   -1.50    2.90
## 31A6TWB2.1    0.364 0.138  1   -1.39    2.12
## 44A7TWB1.1    0.414 0.138  1   -1.34    2.17
##
## Concentracion = 125:
## Bacteria      emmean      SE df lower.CL upper.CL
## sin inocular  0.312 0.134  1   -1.39    2.02
## 31A6TWB2.1    0.695 0.162  1   -1.36    2.75
## 44A7TWB1.1    0.501 0.147  1   -1.37    2.37
##
## Degrees-of-freedom method: containment
## Confidence level used: 0.95

tukey3 <- contrast(emm_concentracion, method = "pairwise", adjust =
"tukey")
tukey3

## Concentracion = 0:
## contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1  0.0553 0.1513 76   0.365  0.9291
## (pvalor x 2 = 1.8582)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.2033 0.1368 76   1.486  0.3034
## (pvalor x 2 = 0.6068)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.1480 0.1246 76   1.188  0.4641
## (pvalor x 2 = 0.9282)
##
## Concentracion = 25:
## contrast              estimate      SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.0143 0.1361 76  -0.105  0.9940
## (pvalor x 2 = 1.9880)
## sin inocular - 44A7TWB1.1  0.0440 0.1444 76   0.304  0.9503
## (pvalor x 2 = 1.9006)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1    0.0582 0.1503 76   0.387  0.9207
## (pvalor x 2 = 1.8414)
```

```
##
## Concentracion = 75:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 0.3344 0.1386 76 2.412 0.0474
## (pvalor x 2 = 0.0948)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 0.2847 0.1389 76 2.050 0.1075
## (pvalor x 2 = 0.2150)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 -0.0497 0.0910 76 -0.546 0.8487
## (pvalor x 2 = 1.6974)
##
## Concentracion = 125:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## sin inocular - 31A6TWB2.1 -0.3827 0.1197 76 -3.198 0.0057
## (pvalor x 2 = 0.0114)
## sin inocular - 44A7TWB1.1 -0.1888 0.0988 76 -1.910 0.1427
## (pvalor x 2 = 0.2854)
## 31A6TWB2.1 - 44A7TWB1.1 0.1939 0.1335 76 1.452 0.3196
## (pvalor x 2 = 0.6392)
##
## Degrees-of-freedom method: containment
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 3 estimates

emm_bacteria <- emmeans(model_varExp, ~ Concentracion | Bacteria)
emm_bacteria

## Bacteria = sin inocular:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.658 0.167 1 -1.46 2.78
## 25 0.633 0.153 1 -1.31 2.57
## 75 0.698 0.173 1 -1.50 2.90
## 125 0.312 0.134 1 -1.39 2.02
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.602 0.157 1 -1.39 2.60
## 25 0.647 0.159 1 -1.37 2.67
## 75 0.364 0.138 1 -1.39 2.12
## 125 0.695 0.162 1 -1.36 2.75
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## Concentracion emmean SE df lower.CL upper.CL
## 0 0.454 0.143 1 -1.37 2.28
## 25 0.589 0.166 1 -1.52 2.69
## 75 0.414 0.138 1 -1.34 2.17
## 125 0.501 0.147 1 -1.37 2.37
##
## Degrees-of-freedom method: containment
## Confidence level used: 0.95

tukey4 <- contrast(emm_bacteria, method = "pairwise", adjust = "tukey")
tukey4

## Bacteria = sin inocular:
## contrast estimate SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25 0.0249 0.1466 76 0.170 0.9982
```

```

(pvalor x 2 = 1.9964)
## Concentracion0 - Concentracion75    -0.0407 0.1678 76    -0.243  0.9949
(pvalor x 2 = 1.9898)
## Concentracion0 - Concentracion125    0.3458 0.1273 76     2.717  0.0398
(pvalor x 2 = 0.0796)
## Concentracion25 - Concentracion75    -0.0656 0.1534 76    -0.428  0.9735
(pvalor x 2 = 1.9470)
## Concentracion25 - Concentracion125    0.3209 0.1073 76     2.991  0.0192
(pvalor x 2 = 0.0384)
## Concentracion75 - Concentracion125    0.3865 0.1351 76     2.862  0.0273
(pvalor x 2 = 0.0546)
##
## Bacteria = 31A6TWB2.1:
## contrast                estimate      SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.0447 0.1419 76    -0.315  0.9891
(pvalor x 2 = 1.9782)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.2384 0.1182 76     2.017  0.1908
(pvalor x 2 = 0.3816)
## Concentracion0 - Concentracion125    -0.0922 0.1453 76    -0.634  0.9207
(pvalor x 2 = 1.8414)
## Concentracion25 - Concentracion75     0.2831 0.1192 76     2.375  0.0907
(pvalor x 2 = 0.1814)
## Concentracion25 - Concentracion125    -0.0475 0.1459 76    -0.326  0.9880
(pvalor x 2 = 1.9760)
## Concentracion75 - Concentracion125    -0.3306 0.1235 76    -2.678  0.0441
(pvalor x 2 = 0.0882)
##
## Bacteria = 44A7TWB1.1:
## contrast                estimate      SE df t.ratio p.value
## Concentracion0 - Concentracion25    -0.1344 0.1345 76    -0.999  0.7502
(pvalor x 2 = 1.5004)
## Concentracion0 - Concentracion75     0.0407 0.0992 76     0.410  0.9765
(pvalor x 2 = 1.9530)
## Concentracion0 - Concentracion125    -0.0463 0.1107 76    -0.418  0.9752
(pvalor x 2 = 1.9504)
## Concentracion25 - Concentracion75     0.1751 0.1292 76     1.355  0.5310
(pvalor x 2 = 1.0620)
## Concentracion25 - Concentracion125    0.0881 0.1382 76     0.637  0.9196
(pvalor x 2 = 1.8392)
## Concentracion75 - Concentracion125    -0.0870 0.1042 76    -0.835  0.8375
0.8375
##
## Degrees-of-freedom method: containment
## P value adjustment: tukey method for comparing a family of 4 estimates

```