



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“DETERMINACIÓN DE UNA DOSIFICACIÓN DE *Trichoderma* PARA TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON PIRETROIDES”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: FABIÁN MARCELO SALINAS SALINAS

TUTOR: Ing. MARCELA YOLANDA BRITO MANCERO

Riobamba –Ecuador

2019

© 2019, **Fabián Marcelo Salinas Salinas**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DE UNA DOSIFICACIÓN DE Trichoderma PARA TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON PIRETROIDES de responsabilidad del señor Fabián Marcelo Salinas Salinas ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

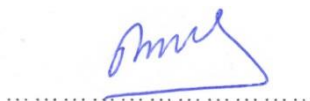
Ing. Marcela Brito Mancero



2019-05-30

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACION

Dr. Iván Ramos Sevilla



2019-05-30

MIEMBRO DEL TRIBUN

Yo, Fabián Marcelo Salinas Salinas soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

A handwritten signature in blue ink that reads "Fabian Salinas". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal dotted line.

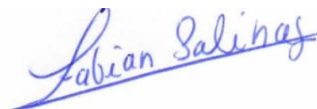
Fabián Marcelo Salinas Salinas

DECLARACIÓN DE AUTENCIDAD

Yo, FABIÁN MARCELO SALINAS SALINAS, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 30 de Mayo del 2019



.....
FABIÁN MARCELO SALINAS SALINAS

C.I. 180435960-0

DEDICATORIA

Dedico mi Trabajo de Titulación a Dios quién me dio fuerza y constancia para seguir adelante mis proyectos personales.

A mi madre quien guía mi camino, me enseñó que nunca hay que rendirse en la vida y todo esfuerzo tiene su recompensa.

A mi familia quienes son mi fuerza en mis proyectos personales y siempre me dieron apoyo a pesar de dificultades para hacer una mejor persona y ahora un mejor profesional.

AGRADECIMIENTO

A la Dirección Distrital de Tungurahua del Ministerio de Agricultura y Ganadería por el Apoyo brindado para el uso del laboratorio Artesanal de bioinsumos, en especial a su director el Ing. Edisson Chango Amaguaña.

A la Corporación Organizaciones Agroproductivas del Cantón Ambato (COACA), por el apoyo brindado para elaboración del presente trabajo de titulación con los equipos y materiales aportados al

Al Lic. Pedro Lara Técnico del laboratorio Artesanal bioinsumos de la Dirección Distrital de Tungurahua del Ministerio de Agricultura y en convenio Corporación Organizaciones Agroproductivas del Cantón Ambato (COACA), quien Apoyo técnicamente el desarrollo del presente trabajo de Titulación mediante facilidades para el uso de las Instalaciones del laboratorio y laboratorio

A mi familia quien con su apoyo incondicional, y confianza depositada en mí, guio la culminación del presente trabajo Titulación

A mi directora de tesis la Ing. Marcela Brito quien con sus conocimientos, permitió el correcto desarrollo de la presente investigación.

A mis Amigos y Futuros Colegas Andrés A, Guillermo R, Diana M, Alex M, Diego S , Anthony P, Diana V, Diego C, Alex E , Jessica N, Felipe P, Felix V, Ivonne C , Juan S, Eliana S , Victoria E, Jennifer L, Andrés S, Diego S, Ana A, Carina A, Rodney R, Dennise C ,Evelyn L, Belen V, Kathy T, Johnny A, Slendy J, Ana P, Andrea R, Jhojana L, Jorge A, Miguel P , Bryan M, Evelyn A, Edisson A y Daniela C , quienes de alguna forma apoyaron el desarrollo de la Investigación.

A Xime, Caro, Eve, Alex, Alexander, Gato por ser mis amigos, estar siempre conmigo

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO 1	
1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1 Antecedentes	5
1.2 Piretroides.....	7
1.2.1 Clasificación y estructura de los Piretroides.....	8
1.2.2 Propiedades Físicoquímicas.....	9
1.2.3 Estabilidad y persistencia de Piretroides.....	10
1.2.4 Degradación de los piretroides	11
1.2.5 Exposición	11
1.2.6 Modo de Acción de Piretroides.....	11
1.2.7 Toxicocinética.....	11
1.2.8 Degradación de los Piretroides en el medio Ambiente.....	12
1.2.9 Afectaciones a la salud por exposición a piretroides.....	13
1.3 Micorremediación	13
1.4 <i>Trichoderma spp.</i>	14
1.5 <i>Trichoderma hamatum</i>	14
1.6 <i>Trichoderma koningii</i>	14
1.7 <i>Trichoderma harzianum</i>	14
1.7.1 Taxonomía.....	15
1.7.2 Características	15
1.7.3 Macroscopía	15
1.7.4 Microscopía	16
1.7.5 Beneficios del hongo <i>Trichoderma spp.</i>	16

1.7.6	<i>Unidad formadora de colonias (UFC)</i>	16
1.7.7	<i>Condiciones de crecimiento</i>	16
1.7.8	<i>Modo de acción</i>	17
1.7.9	<i>Determinación de la dosis Trichoderma spp</i>	17
1.7.10	<i>Curva de crecimiento</i>	17
1.7.11	<i>Cámara Neubauer</i>	18
1.7.12	<i>Método de QuEChERS</i>	18
1.7.13	<i>Cromatografía de gases con detector selectivo de masas (MSD)</i>	18
CAPÍTULO 2		
2	MARCO METODOLÓGICO	19
2.1	Tipo y diseño de la investigación	19
2.1.1	<i>Por el tipo de investigación</i>	19
2.1.2	<i>Por la temporalidad</i>	19
2.1.3	<i>Por el tipo de enfoque</i>	19
2.1.4	<i>Por el diseño de investigación</i>	20
2.2	Diseño experimental	20
2.3	Unidad de Análisis	21
2.4	Población de estudio	21
2.5	Tamaño de la Muestra	21
2.6	Selección de muestra	22
2.7	Hipótesis y especificación de variables	22
2.7.1	<i>Hipótesis general</i>	22
2.7.2	<i>Variables</i>	22
2.8	Etapas de Investigación	23
2.8.1	<i>Primera etapa: Identificación y caracterización del suelo del Cultivo de fresa</i>	23
2.8.1.1	<i>Georreferenciación y localización del Cultivo de fresas</i>	23
2.8.1.2	<i>Localización y medición del área del cultivo de fresas</i>	24
2.8.1.3	<i>Delimitaciones de las unidades experimentales</i>	24
2.8.1.4	<i>Caracterización del suelo cultivo de fresa</i>	24

2.8.2	<i>Segunda etapa: Obtención de cepas de Trichoderma</i>	25
2.8.2.1	<i>Descripción del Lugar</i>	25
2.8.2.2	<i>Producción de las cepas de Trichoderma</i>	26
2.8.3	<i>Tercera etapa: Trabajo en Campo</i>	32
2.8.3.1	<i>Identificación las unidades experimentales</i>	32
2.8.3.2	<i>Aplicación de la Cypermetrina y de la Deltametrina</i>	33
2.8.3.3	<i>Recolección de las muestras iniciales</i>	34
2.8.3.4	<i>Aplicación de las dosis de Trichoderma spp en el suelo</i>	35
2.8.3.5	<i>Recolección de las muestras finales</i>	36
2.8.3.6	<i>Análisis de laboratorio</i>	36

CAPÍTULO 3

3	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
3.1	Primera etapa: Identificación y caracterización del suelo del Cultivo de fresa	37
3.1.1	<i>Análisis microbiológico del suelo</i>	40
3.2	Segunda etapa: Obtención de cepas de <i>Trichoderma spp</i>	40
3.2.1	<i>Conteo de esporas y determinación de Dosificación</i>	41
3.3	Caracterización y dosificación de los Piretroides	42
3.4	Comportamiento de <i>Trichoderma spp</i> en el suelo	44
3.5	Análisis estadístico	46
3.5.1	<i>Porcentaje de Remoción de la Cypermetrina sin tratamiento</i>	48
3.5.2	<i>Porcentaje de la Remoción sin tratamiento de la Deltametrina</i>	50
3.5.3	<i>Porcentaje de Remoción del <i>Trichoderma</i> al tratar <i>Cypermetrina</i> y <i>Deltametrina</i></i> ...	52
3.5.4	<i>Selección de la dosis de dosis</i>	59

CONCLUSIONES	60
---------------------------	-----------

RECOMENDACIONES	61
------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Piretroides Utilizados en el cultivo de fresas.....	7
Tabla 1-2 Estructura de Piretroides	8
Tabla 1-3 Estructura Principales Piretroides	9
Tabla 1-4 Propiedades fisicoquímicas de los principales piretroides.....	9
Tabla 1-5 Ingesta diaria aceptable (IDA) y Límite máximo de residuos (LMR).	11
Tabla 1-6 Taxonomía del <i>Trichoderma spp</i>	15
Tabla 2-1 Tratamientos del Experimento	20
Tabla 2-2 Cálculo Tamaño de Muestra	21
Tabla 2-3 Puntos de Georreferenciación del cultivo de fresa	23
Tabla 2-4 Parámetros analizados para caracterizar el suelo del cultivo de fresas	25
Tabla 2-5 Concentración de las esporas del producto.....	31
Tabla 2-6 Concentración de esporas por cepa	31
Tabla 2-7 Dosis aplicadas de la Cypermetrina y Deltametrina.....	33
Tabla 2-8 Dosis calculadas de Cypermetrina Y Deltametrina	34
Tabla 2-9 Dosificaciones utilizadas.....	35
Tabla 3-1 Reporte de los parámetros para la caracterización del suelo	38
Tabla 3-2 Características macroscópicas de la cepa de <i>Trichoderma spp.</i>	40
Tabla 3-3 Características Microscópicas de la cepa de <i>Trichoderma.</i>	41
Tabla 3-4 Conteo de esporas	42
Tabla 3-5 Parámetros para determinar el comportamiento del <i>Trichoderma spp</i>	44
Tabla 3-6. Degradación de la Cypermetrina	46
Tabla 3-7. Degradación de la Deltametrina.....	47
Tabla 3-8 Análisis de la varianza % de Remoción sin tratamiento de la Cypermetrina.....	48
Tabla 3-9 Análisis de varianza del % de Remoción Sin tratamiento Tukey al 5%	49
Tabla 3-10 Análisis de la Varianza Porcentaje de Remoción sin tratamiento de la Deltametrina....	50
Tabla 3-11 Análisis de varianza del % de Remoción sin Tratamiento Tukey al 5%.....	51
Tabla 3-12 Varianza de la Concentración removida y % Remoción de la Cypermetrina	52
Tabla 3-13 Varianza de la Concentración removida y % Remoción de la Deltametrina	54
Tabla 3-14 Análisis de varianza del % de Remoción de Cypermetrina por Tukey al 5%	56
Tabla 3-15 Análisis de varianza del % de Remoción Deltametrina por Tukey al 5%.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Componentes de Estructura de la Permetrina	8
Figura 1-2 <i>Curva de crecimiento de los Trichoderma</i>	17
Figura 1-3 Curva de crecimiento del <i>Trichoderma</i>	18
Figura 2-1 Localización del cultivo para Micorremediación.....	23
Figura 2-2 Cámara de Neubauer	29
Figura 2-3 División de la zona centro	30
Figura 2-4 Cuadros de Conteo de esporas	30

INDICE DE ANEXOS

Anexo A Mapa de identificación

Anexo B Reporte de parámetros para la caracterización del suelo estudio

Anexo C Taxonomía del *Trichoderma spp*

Anexo D Identificación, Preparación Medio Cultivo y Siembra Caja Petri

Anexo E Incubación, Identificación Microbiana, Preparación de Sustrato

Anexo F Replicación, Cosecha, Dilución seriada y Contaje

Anexo G Fumigación y Toma de Muestras

Anexo H Contaje Esporas Cámara 1

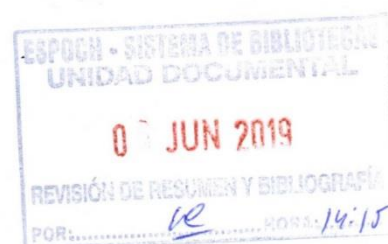
Anexo I Contaje Esporas Cámara 2

Anexo J Análisis de laboratorio

RESUMEN

El objetivo de determinar una dosificación de *Trichoderma spp* para tratamiento de suelos contaminados con Piretroides (Cypermotrina y Deltametrina), experimento que se desarrolló en la parroquia Huachi Grande, cantón Ambato, provincial de Tungurahua. La fase inicial consistió en la Localización y Georreferenciación del cultivo de fresa. En la fase de laboratorio se realizó la reproducción a partir de un producto comercial (TricoFert) que contenía 4 cepas de *Trichoderma spp*. (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma sp* y *Trichoderma koningii*), se realizaron los análisis fisicoquímicos y biológicos para caracterizar el suelo, y se determinó su influencia en el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en el suelo durante el tratamiento. En el ensayo se empleó un diseño transversal, experimental basado en un DCA con 5 repeticiones y 4 tratamientos, T0 (testigo); T1 (suelo+ piretroide+ 2,5ml/L *Trichoderma spp*.); T2 (suelo+ piretroide+ 5ml/L *Trichoderma spp*.); T3 (suelo+ piretroide+ 10ml/L *Trichoderma spp*.), para la cuantificación y la realización de los análisis estadísticos, se obtuvo el porcentaje de remoción a partir de la comparación de las concentraciones iniciales y las concentraciones finales de los piretroides en el suelo. La variable estudiada fue la degradación de piretroides por parte *Trichoderma spp* expresada en Porcentaje de remoción del contaminante, mediante la toma muestras en cada unidad experimental se determinó que el Tratamiento T1 obtuvo el mejor Porcentaje de remoción de la Cypermotrina fue de 29,07%, mientras que de la Deltametrina fue de 35,26 %, resultando como el mejor tratamiento debido a la actividad enzimática de la difenil-dioxígeno oxidoreductasas, a pesar de la escases de nutrientes en el suelo. Se recomienda realizar el tratamiento de suelo contaminados con Piretroides con cepas *Trichoderma spp*, pero controlando la intervención de las variables: Precipitación, pH, Temperatura, Cantidad Materia Orgánica y nutriente, misma que influyen en el crecimiento de las cepas en suelo.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGIA, PROTECCIÓN AMBIENTAL, MICORREMEDIACIÓN>, <BIORREMEDIACIÓN>, <HONGO (*Trichoderma Spp*)>, <CYPERMETRINA>, <DELTAMETRINA>, <PIRETROIDES>.



ABSTRACT

The following investigation's objective was to determine a dosage of *Trichoderma spp* for treatment of soils contaminated with Pyrethroids (Cypermethrin and Deltamethrin), the experiment that was developed in the Huachi Grande, canton Ambato, Tungurahua province. The initial phase consisted of mla Location and Georeference of strawberry cultivation. In the laboratory stage, reproduction was carried out from a commercial product (TricoFert) containing 4 cepas of *Trichoderma spp.* (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma sp* and *Trichoderma Koningii*), physicochemical and biological analyzes were carried out to characterize the soil, and determined its influence on the growth of the Cepas *Trichoderma* in the soil during the treatment. In the trial, a transverse, experimental design based on a DCA with 5 repetitions and 4 treatments, T0 (control) was used; T1 (soil + pyrethroid + 2.5ml / L *Trichoderma spp.*); T2 (soil + pyrethroid + 5ml / L *Trichoderma spp.*); T3 (soil + pyrethroid + 10m1L *Trichoderma spp.*), For the quantification and the realization of the statistical analyzes, the percentage of removal was obtained from the comparison of the initial concentrations and the final concentrations of the pyrethroids in the soil. The variable studied was the degradation of pyrethroids by *Trichoderma spp* expressed in Percentage of removal of the contaminant, by taking samples in each experimental unit it was determined that Treatment T1 obtained the best Percentage of removal of Cypermethrin was 29.07% while that of Deltamethrin was 35.26%, as the best treatment due to the enzymatic activity of diphenyl-dioxygen oxidoreductases, despite the lack of nutrients in the soil. It is recommended to carry out the treatment of soil contaminated with Pyrethroids with *Trichoderma spp* cepas, but controlling the intervention of the variables: Precipitation, pH, Temperature, Quantity Organic matter and nutrient, which influence the growth of the cepas in soil.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY, ENVIRONMENTAL PROTECTION, MIORREMEDICIÓN, BIORREMEDITIÓN>, <HONGO (*Trichoderma Spp*)>, <CYPERMETHRIN>, <DELTAMETHRIN>, <PYRETHROIDS>.



INTRODUCCIÓN

La agricultura es la base de la producción de alimentos a nivel mundial, En Sudamérica las exportaciones de alimentos hacia Norteamérica y Europa, han generado una alta demanda de cultivo de frutales generado así la dependencia de monocultivos. En esos mercados, las exigencias de calidad sobre los productos son muy alta, por lo que los agricultores necesitan eliminar las plagas de sus cultivos; En las últimas décadas se han utilizado pesticidas y fertilizantes químicos para controlar plagas, debido a su alta permanencia en el suelo y en el agua están ocasionando impactos negativos en los ecosistemas, su interacción directa con la sociedad está ocasionando problemas de Salud. Según (Gliessman-Stephen, 2002, p. 340), la prevención ambiental es fundamental en la agricultura.

El Ecuador es considerado como uno de los países más agrícolas de la región gracias a su gran variedad de pisos climáticos en sus 4 regiones, por lo que existe gran diversidad de producción. La agricultura empleada en estos pisos climáticos es considerada como no sostenible, por lo que es evidente la pérdida de la biodiversidad en los cultivos, la acumulación de residuos orgánicos e inorgánicos en los suelos cultivables genera pérdida del equilibrio del suelo ,Por lo que es necesario implementar un manejo sostenible.

En las zonas cultivables de la provincia de Tungurahua, Principalmente en la zona sur del cantón Ambato es evidente el deterioro del suelo, En la parroquia de Huachi Grande se caracteriza por la agricultura como una de las principales fuentes económicas, su territorio cultivable se extiende alrededor de 747,12 Ha de las cuales 40% corresponde a la siembra de Frutales.(GAD Huachi Grande, 2015, p. 11).

La producción de fresa se realiza en suelos con textura Franco-Arenosa-limosa, para su mejor manejo se realiza en camas cubiertas con plástico de color negro. En las últimas décadas en las zona cultivables se aplica Piretroides de una forma inadecuada para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch) y *Drosophila suzukii*, la dosificación suministrada de Piretroides en los cultivos es especificada de acuerdo a los técnicos de las casas comerciales de agroinsumos. (Guerrero y Molina Rodríguez, 2015, pp. 1-15) .

Las investigaciones realizadas sobre Piretroides, el tiempo de permanecen de la sustancia en el Ambiente está ligada con las modificaciones químicas en su estructura, que les permite ser más

resistentes a la luz solar y al calor. Su tasa de degradación en los suelos es moderada. Su vida media está relacionada con la acumulación.

En la actualidad es necesario implementar nuevas tecnologías como una de las estrategias sostenibles, una de ellas es la utilización de hongos en procesos de descontaminación de agentes xenobioticos.(Arias, 2014, p. 55), La Micorremediación es considerada como una técnica menos destructivas en comparación con las tecnologías de tratamientos físicos y químicos.

JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación comprende determinar una dosis óptima de *Trichoderma spp* para tratar suelos contaminados con Piretroides, permitiendo generar una base de información sobre los tratamiento utilizados para degradar Piretroides, ya que en país no existen estudios suficientes, las cepas inoculadas del hongo serán obtenidas a partir del producto comercial iTricofert que contiene una asociación de las cepa *Trichoderma spp*, la reproducción en las instalaciones del laboratorio de bioinsumos del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Dirección Distrital de Tungurahua en convenio con la Corporación Organizaciones Agroproductivas del Cantón Ambato (COACA).

La finalidad de la presente tesis es obtener datos que respalden estudios previos sobre la presencia de Piretroides en el cultivo de fresa, en la parroquia de Huachi Grande, cantón Ambato, provincia de Tungurahua y que permita obtener información sobre la Micorremediación en suelos. Por lo que las cepas obtenidas serán aplicadas, en un cultivo fresas de la Parroquia, mediante las unidades experimentales ubicadas de manera aleatoria en el sembrío, se optó a trabajar con una asociación de las cepas de *Trichoderma spp*. Por su facilidad de aislamiento y su alta grado remoción de xenobioticos.(Cano, 2011, pp. 16-23). Las principales cepas hongos nativas encontradas en la provincia de Tungurahua fueron los géneros (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*, *Pyrenochaeta spp.*) principalmente se encuentran en el cultivos de Papa y Frutilla. (Paucar, Díaz y Alvarado, 2011, p. 3)

En las raíces de las plantas se encuentra la mayor acumulación de compuestos xenobioticos como son: Cypermetrina y Deltametrina, estas sustancias tiene la capacidad de fijarse a los suelos, para su restauración es necesario implementar tecnologías de Biorremediación como son los organismos vivos. El *Trichoderma spp* será utilizado en los procesos de remediación por su facilidad de reproducción y por su amplia aplicación en los cultivos, por lo que las técnicas a utilizar en la presente investigación concuerdan con los principios del Buen Vivir, mismos que

se mencionan el artículo 14 de la Constitución de la República del Ecuador. (Asamblea Nacional del Ecuador y Presidencia de la República, 2008).

En las zona frutícolas el uso discriminado de plaguicidas está generando impactos ambientales en los cultivos y afectaciones en la salud de los agricultores, en la recuperación de los suelos se utiliza tratamientos fisicoquímicos, mismos que son muy complejos y poco accesibles para los agricultores, por lo que es necesario desarrollar técnicas de recuperación de suelos con microorganismos que resistan alta concentraciones de plaguicidas como es la familia de los Piretroides y sus derivados.

La Micorremediación es considerada como una técnica de restauración menos abrasiva y proporciona de nutrientes a los suelos tratados. La tesis permitirá conocer el estado actual de los cultivos y el papel que desempeñan los hongos en procesos de restauración. La línea de investigación del presente estudio corresponde a protección ambiental y su sublínea pertenece a Biotecnología mismas que son ofertadas por la Carrera de Biotecnología Ambiental de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para trabajos de Titulación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar una dosificación de *Trichoderma* para tratamiento de suelos contaminados con Piretroides.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las propiedades Físicas, Químicas y Biológicas que presenta el suelo de estudio.
- Analizar el comportamiento de las dosificaciones de *Trichoderma*.
- Establecer una dosis óptima de *Trichoderma*.

CAPITULO 1

1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes

Los primeros problemas de contaminación con piretroides surgieron en la década de los 90 en Centroamérica, se estima que 7,4000 toneladas métricas de organofosforados incluyendo a los piretroides son utilizadas anualmente, según (Pan American Health Organization. y World Health Organization., 2002, pp. 12-30). En México se realizó determinación de compuestos organofosforados en los suelos del Valle Yaqui, se analizaron 21 muestras correspondientes a suelos agrícolas, los resultados obtenidos fueron analizados con la técnica de cromatografía de gases, se encontraron residuos de compuestos de Piretroides generados por las actividades agrícolas. (Moreno y Almada, 2012, pp. 306-309) .

Estudios en Europa demuestran que al aplicar pesticidas como Cypermetrina y Deltametrina mediante el roció produce una contaminación entre el 30 y el 50% del producto no alcanza su objetivo y se difunde en el suelo y en el aire, ya que el suelo es considerado el principal medio de transferencia de moléculas, lo que implica una alta probabilidad para la contaminación del medio ambiente. El suelo al reducir su capacidad de depuración natural aumenta las emisiones de gases de efecto invernadero, según los informe presentados por la Agencia Europea de Medio Ambiente en el año 2012 donde se describe, que los diferentes pesticidas contribuyen a la degradación de las masas de agua, afectando al 20% de las aguas subterráneas y el 16% de los ríos, ahora clasificados como en estado químico deteriorado. (Machinery, 2018, pp. 1-15).

En los informes presentados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), manifiesta que 300 pesticidas fueron utilizados para combatir plagas en fresa especialmente Chinche, las muestras recolectadas fueron sometidos a análisis cromatógrafos rigurosos, que demostraron la presencia de residuos de Piretroides mismo que causan degradación del suelo. (US EPA, 2017). En el Ecuador se realizó un estudio sobre los residuos de plaguicidas en plantas de brócoli por lo que es necesario evaluar los niveles residuales de estas sustancias en muestras de brócoli. Según el III Censo Agropecuario Nacional 2012, existen alrededor de 3.639 hectáreas sembradas de brócoli, El uso de plaguicidas, para el control de varias plagas como pulgón (*Brevicoryne brassicae*), Los residuos de los plaguicidas son considerados como la principal fuentes de contaminación. (Moreno y Almada, 2012, p. 307).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron los estándares internacionales sobre los límites máximos de residuos (LMRs) de varios contaminantes, LMR es la concentración máxima de residuos de un plaguicida o sus metabolitos (expresada en mg/kg), los LMRs se estiman en base a la exposición, algunos estudios toxicológicos demostraron que los Piretroides en el suelo tienen un LMR muy superiores a los límites permisibles por la unión europea (0,050 μ /g).(Pazmiño, 2015, pp. 42-45). En la provincia de Azuay en la parroquia agrícola San Joaquín la fertilidad del suelo fue afectada por la gran cantidad de Plaguicidas. (Illescas, 2017, p. 24).

En el estudio de impacto ambiental al cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) en la parroquia Huachi Grande, cantón Ambato, se identificó que los desechos agrícolas causan contaminación ambiental. Según los registros de la EPA 300 productos tóxicos son utilizados para combatir plagas en el cultivo de fresa, estos productos fueron sometidos a análisis rigurosos para identificar su toxicidad. (US EPA, 2017).

En estudios realizados en la corteza de la frutilla, se encontraron valores de residualidad superiores a 120 ppb, sobrepasando el límite máximo de residuos permitidos (LMR) de 70 ppb para la Cypermetrina (Curillo, 2015, pp. 45-52). Estudios realizados en Universidad Técnica de Ambato sobre la tolerancia de las cepas del *Trichoderma spp* demuestran que existe crecimiento de hongo en presencia de Cypermetrina permitiendo su esporulación en 31.25%. Pero se recomienda realizar estudios de degradación de contaminantes por parte de Hongo *Trichoderma*

spp, permitiendo tener mejor certeza del efecto de supervivencia del hongo en suelo en presencia de insecticidas. (Toro, 2012, pp. 60-80).

En una evaluación del impacto ambiental causado por el cultivo intensivo de fresa (*Fragaria vesca*) en la parroquia Huachi Grande, cantón Ambato, se identificó que las actividades agrícolas generan desechos que causan problemas ambientales, con el propósito de disminuir la contaminación se empleará buenas prácticas agrícolas con el ambiente. (Bucheli, 2015, p. 18).

En Ecuador existen escasos estudios acerca de la Micorremediación de las Piretroides empleando cepas de *Trichoderma spp*, no obstante en los últimos años se han realizado investigaciones que se orientan a Micorremediación dentro de este grupo destacan el siguiente estudio: (Torres, 2014, p. 19) en su trabajo de titulación evalúa la Biodegradación de un insecticida Piretroide en un cultivo de papas en la provincia de Carchi.

1.2 Piretroides

Los Piretroides se desarrollaron a partir de Piretro, sustancia extraída de las flores del crisantemo. Se caracteriza por ser resistente a la luz solar (Fotoestables), su tiempo de persistencia es de 6 meses aproximadamente. (Mancheno y Kroeger, 2001, p. 40). Su principal función es exterminar bacterias, nematodos, ácaros, moluscos, insectos y plantas no deseadas. (Atsdr, 2003, p. 3) Los compuestos Piretroides se encuentran constituidos por seis componentes principales: derivados de ácido crisantémico, ácido piretrico, piretrolona, cinerolona y jasmolona que son esteres, se dividen en dos tipos: a) sin grupo alfacyano, como el permetrina, y b) con grupo alfacyano, como fenvalerato y cypermetrina. (Ramírez y Lacasaña, 2001, p. 69).

Tabla 1-1 Piretroides Utilizados en el cultivo de fresas

Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Dosis	DL 50	Categoría Toxicológica	Plaga que controla
Decís	Deltametrina	0,3 l/Ha	3 g/kg	II	<i>ApHys gossypii</i> y <i>Myzus persicae</i>
Rambler	Cypermetrina	0,4 l/Ha	2,5 g/kg	II	<i>Tetranychus urticae</i>
Pirestar	Permetrina	0,4 l/Ha	4g/Kg	II	<i>Helicoverpa armigera</i>

Fuente: (Bloomquist, 2013, p 46).

Realizado por: SALINAS, Fabián 2019

1.2.1 Clasificación y estructura de los Piretroides

El piretro están constituido por: piretrolona y cinerolona, los cuales son ésteres conformados de dos ciclopentanos, (R':-CH=CH2)\-CH3); el ácido crisantémico y el ácido pirético son ácidos ciclopropanocarboxílicos (R=-CH3 o -CO2CH3). . (Ramírez y Lacasaña, 2001, p. 69).

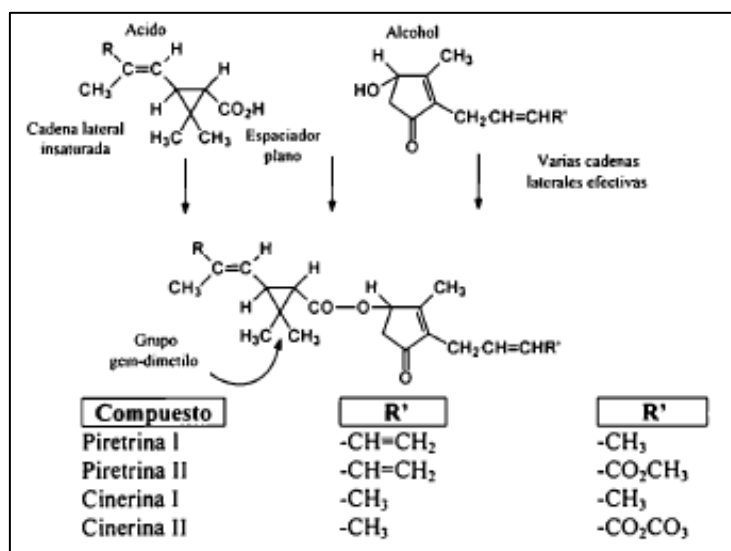


Figura 1-1 Componentes de Estructura de la Permetrina

Fuente:(Masuh, 1998, p. 3)

Tabla 1-2 Estructura de Piretroides

NOMBRE	ESTRUCTURA
Aletrina	
Bioresmelrina	
Permetrina	

Fuente:(Masuh, 1998, pp. 3-19)

Realizado por: SALINAS, Fabian 2019

La unión del ácido crisantémico con el alcohol aletrolona permite formar la aletrina, al reemplazar su grupo ceto se obtiene la Bioaletrina. Los anillos de la ciclopentenona (2,4 y 3,4 dimetilbencilo) pueden ser sustituidos por un sistema bencílico que permite conservar sus propiedades, a su vez al reemplazar sistema bencílico por un grupo aromático se forma la Bioesmetrina (trans-crisantemato de 5-bencil-3furilmetilo), cuando se reemplaza el grupo isobutenil de la Bioesmetrina por un grupo Diclorovinilo se forma la Cypermetrina . Finalmente al sustituir el Diclorovinilo por el Dibromovinilo, en el grupo ciano en alfa del anillo aromático se obtiene la Deltametrina. (Masuh, 1998, pp. 3-27) .

Tabla 1-3 Estructura Principales Piretroides

Nombre	NOMBRE CAS	Estructura Química
Cypermetrina [52315-07-8]	Ciano (3-fenoxifenil) metil éster del ácido 3-(2,2-dicloroetenil)2,2dimetil ciclopropano carboxílico	
Deltametrina [52918-63-5]	(S)-α-ciano-3-fenoxifenil metil éster del ácido-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetil ciclopropanocarboxilato	
Permetrina [52645-53-1]	(3-fenoxifenil) metil éster del ácido 3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetil ciclopropanocarboxílico	

Fuente: (Torres, 2014, p. 8)

Realizado por: SALINAS, Fabián 2019

1.2.2 Propiedades Físicoquímicas

Tabla 1-4 Propiedades fisicoquímicas de los principales piretroides

Insecticida	Densidad	Límite permisible fresa	Solubilidad en Agua	Límites permisibles del Suelo
permetrina	1,2 g/cm ³	1000 mg/kg	0,006 mg/L	0,05 mg/Kg
Cypermetrina	0,94 g/cm ³	70 mg/kg	0,004 mg/L	0,05 mg/Kg
Deltametrina	0,89 g/cm ³	200 mg/kg	0,003 mg/L	0,05 mg/Kg

Fuente:(Torres, 2014, p. 10)

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Cypermetrina

La Cipermetrina en estado líquido es de color amarillo, en estado sólido de color café claro con una densidad de 1.28 g/ml. a 200 °C alcanza su punto de ebullición, En el agua su solubilidad es 0.01 mg/L a 25 °C.” (INECC MEXICO, 2010). El compuesto es más estable en medios alcalinos,

su solubilidad depende de fotólisis, su principal función es control de plagas en el follaje y en la superficie del suelo. Su efecto adverso en el suelo es la afectación a microbiana, a niveles bajos la cipermetrina se infiltra hacia las agua subterráneas. (Moreno, 1993, pp. 2-7)

Deltametrina

La Deltametrina en estado sólido tiene un color blanco con una densidad específica de 0,5 g/cm³. Entre 101 y 102 °C adquiere su estado de fusión. Su solubilidad en agua es igual a 0.002 mg/L a 25 °C” (INECC MEXICO, 2010). Su principal afectación se da en la abejas por su toxicidad puede causar alteraciones en su sistema de orientación (Gallo, 2006), en la agricultura se utiliza para el control de plagas. La Deltametrina en el suelo es menos móvil en la fase gaseosa, por lo que considera como el Piretroide más persistente (Ortiz, Yáñez y Díaz-Barriga, 2004).

1.2.3 Estabilidad y persistencia de Piretroides

Los Piretroides tienen una presión de vapor baja, su volatilización es lenta desde el suelo hacia la atmosfera. (Fernández, 2010, pp. 15-23). los residuos de los piretroides son almacenados en el suelo, debido a su baja polaridad. (Shimadzu, 2019, p. 2). La concentración Cipermetrina y de la Deltametrina en suelo puede reducirse debido a la escorrentía superficial (INIAP, 2002, p. 120).

El tiempo de persistencia de los piretroides depende de la alcalinidad del suelo y la exposición a la luz solar, El tiempo de persistencia de la Cypermetrina en el medio ambiente es de 21 días y de la Deltametrina es de 15 días aproximadamente. (Martinez, 2003, p. 25). Un factor importante en el Tiempo de persistencia es la cantidad de materia orgánica presente el suelo a mayor contenido de materia, mayor será su fijación (Wadhwa *et al.*, 2010, p. 583).

1.2.4 Degradación de los piretroides

La degradación de la Cypermctrina y de Deltametrina ocurre mediante la sustitución del anillo del ciclo propano por acción fotoquímica. La deshalogenación y descarboxilación del grupo dihalovinilo ocurre solamente en los piretroides de tipo II. (Liu, Liu y Liu, 2010, p. 10) . “La fotodegradación de los piretroides sigue una cinética de primer orden, su vida media en el suelo es de 55 días, en el agua varía entre 34 a 165 días, Los piretroides se degradan”. (Sharom, 1989, p. 29).

1.2.5 Exposición

Tabla 1-5 Ingesta diaria aceptable (IDA) y Límite máximo de residuos (LMR).

Piretroide	IDA (mg.kg-1.p.c.)	LMR (mg.kg-1)	Toxicidad
Permetrina	0,05	0,01-0,5	
Cypermctrina	0,05	0,02-0,1	II
Lambda-cialotrina	0,05	0,02-2,0	II
Bifentrina	0,03	0,02-0,7	II
Deltametrina	0,01	0,05-1,0	II
Beta-Cypermctrina	0,01	0,05-0,5	II

Fuente:(Santos, Areas y Reyes, 2007, p. 342)

Realizado por: SALINAS, Fabián 2019

1.2.6 Modo de Acción de Piretroides

Los Piretroides como Deltametrina puede generar ataxia, descoordinación, colesteatosis y salivación en los mamíferos (Bloomquist, 2013). “Los Piretroides Tipo II pueden causar alteraciones en las terminales nerviosas motoras, generando la liberación del transmisor producto de la despolarización de la membrana. Los piretroides de tipo II se asocian con una cinética de activación más rápida en los canales de sodio. El mayor efecto de toxicidad de los piretroides de tipo II se atribuye principalmente al efecto hiperexcitativo en los axones, resultado de la despolarización de la membrana”(Schleier y Peterson, 2010, p. 101).

1.2.7 Toxicocinética

Los piretroides son rápidamente absorbidos por el tracto gastrointestinal, En el trato respiratorio se concentran a través de la inhalación de polvo y son menos absorbidos a través vía dérmica. En

estudios de absorción a través de la piel de las ratas, se demostró que el 1% de la C14-Cypermtrina fue absorbida después de 8 horas al aplicar una concentración de 3 ml, La Deltametrina es absorbida rápidamente hasta llegar al sistema nervios, su vida media plasmática es de 38,5 horas después de suministrar una dosis de 26 mg.kg-1. Se administró una dosis de 1 a 5 mg.kg-1 de Cypermtrina. Un día después se verifico la radioactividad residual en el tejido adiposo, hígado, riñón, sangre, músculo y cerebro, se encontró 2 µg.g-1 en el tejido adiposo, 0,005-0,024 µg.g-1 en el cerebro. Los niveles de residuos disminuyeron rápidamente excepto en el tejido adiposo”(Scott y Ramsey, 1987, p. 142)

1.2.8 Degradación de los Piretroides en el medio Ambiente

Los piretroides en el medio ambiente se degradados más rápidamente por la acción de luz solar, la lluvia ayuda a remover piretroides en la atmosfera, en el suelo se adhieren fuertemente y son menos móviles. Al aplicar por vía de roció se puede encontrar sus residuos en las hojas, tallos y frutos de las plantas (Atsdr, 2003, p. 3). En los análisis realizados por (Curillo, 2015, p. 4), se evaluó la concentración de plaguicida en ppb el cual demostró que la corteza de frutilla contiene mayores niveles de residualidad con valores superiores a 120 ppb y 75,63 ppb respectivamente, los cuales sobrepasaron el límite máximo de residuos permitidos (LMR) en frutilla para la Cypermtrina de 70ppb.

En el aire, los piretroides que se encuentran en fase de vapor se degradan a través de una reacción oxidativa o por fotólisis directa, mientras que los que están en forma de partícula se degradan más lentamente. En el agua, los pesticidas también se degradan mediante fotólisis en la superficie de los cuerpos hídricos, la velocidad de degradación en el agua puede incrementarse debido a los agentes fotosensibilizantes (ácidos fúlvicos y húmicos). Generalmente la hidrólisis se deba cuando se tiene condiciones alcalinas y temperaturas de 20 °C. Además, los piretroides se degradan fácilmente por acción de microorganismos en el suelo, el tiempo de degradación de los piretroides en medio ambiente es 90 días aproximadamente.(Fernández, 2009, p. 29)

1.2.9 Afectaciones a la salud por exposición a piretroides

Los piretroides de Tipo II (Cypermctrina y Deltametrina) provocan coreoatetosis y salivación (síndrome-CS). Para determinar la toxicidad de los piretroides en el cuerpo humano, se realiza un análisis a nivel de los tejidos del hígado para identificar adenomas hepatocelulares, carcinomas y tumores. La exposición diaria promedio es de $0.117 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, pero en ciertas zonas de fumigación la exposición llega a ser de 5 a $25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. (Schleier y Peterson, 2010, p. 111) .

1.3 Micorremediación

Es un proceso donde los hongos son utilizados para degradar residuos químicos en el ambiente mediante la actividad enzimática. Algunos hongos son hiperacumuladores, capaces de absorber y concentrar metales pesados .(Stamets, 1998, p. 1). La remoción de componentes recalcitrantes y tóxicos se lleva a cabo durante varias semanas incluso meses, los compuestos con alta masa molecular son difíciles de degradar. Las estructuras miceliales necesitan de un tiempo de adaptabilidad para degradar piretroides, los compuestos degradados son utilizados como fuentes de nutrición para los hongos (Coello, 2011, p. 15; Torres, 2014).

Según (Thomas, 2000), la Micorremediación es un proceso de descontaminación utilizando agentes biológicos, los micelios de los hongos son estructuras capaces de asimilar compuestos tóxicos, en su interior los procesos metabólicos y enzimáticos permiten transformar compuestos tóxicos en sustancias menos nocivas. (Stamets, 2005, pp. 130-210).

El uso indiscriminado de los plaguicidas han sido objeto de numerosas restricciones en varios países donde existe una fuerte presión por parte de los consumidores que exigen la limitación del uso de estos productos (Alvarado, Ulacio y Sanabria, 2011, p. 219). Al utilizar hongos nativos en los procesos de regeneración de nutrientes contribuimos con la agricultura orgánica, ya que permite acumular compuestos metabolizados.

1.4 *Trichoderma spp.*

Es un hongo que actúa como controlador biológico, produce micotoxinas que actúan en la inhibición de agentes patógenos presentes en la plantas. (Insuasty *et al.*, 2014, p. 3). Es un organismo dominante en los suelos, debido a su naturaleza agresiva y su capacidad metabólica para competir con otros microorganismos (Rosero, 2008, p. 26).

1.5 *Trichoderma hamatum*

Es un hongo que actúa como un agente de biocontrol de nematodos. Controla patógenos de origen vegetal como *Pythium*, *Phytophthora* and *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis Basicola*..(Bravennan, 2008)

1.6 *Trichoderma koningii*

Es un hongo caracterizado por su actividad bacteria, para lo cual secreta proteínas y enzimas que actúan como agentes patógenos, es utilizado en la germinación de semillas para evitar pudrición. (Hernández-Ruiz, Álvarez-Orozco y Ríos-Osorio, 2016).

1.7 *Trichoderma harzianum*

Es un hongo heterótrofo, filamentoso consta de una pared celular compuesta por quitina, sus principales fuentes de carbono son los carbohidratos como: pectina y almidón. (Infante, 2009). *Trichoderma harzianum* degrada algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente, en la agricultura estimula el crecimiento de las plantas. Actúa como controlador biológico frente a microorganismos fitopatógeno.(Cárdenas, 2010)

1.7.1 Taxonomía

Tabla 1-6 Taxonomía del *Trichoderma spp*

Taxón	Nombre
Súper Reino	Eucariota
Reino	Fungi
Filum	Ascomycota
Subfilum:	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

Fuente:(Torres, 2014, p. 14).

Realizado por: SALINAS, Fabián ,2019

1.7.2 Características

El *Trichoderma spp* tiene un desarrollo acelerado y emite gran cantidad de esporas verdes, ligeramente algodonoso parecido a un moho, de color verde oscuro. El hongo actúa como un bioestimulante del desarrollo de las raíces.(Falconi, 2013).

1.7.3 Macroscopía

Las colonias de esta especie, en una temperatura de 20-25°C, pueden alcanzar un diámetro mayor de 9 cm en 5 días. Inicialmente su crecimiento micelial es color blanco, de textura algodonosa y luego se van tornando a blanco-verdoso hasta llegar a un verde total con una textura aterciopelada levemente correosa. En algunas ocasiones se pueden observar estructuras de resistencia que son pequeñas, blanquecinas y algodonosas. (Samson, Hoekstra y Frisvad, 2004, pp. 210-240).

1.7.4 Microscopía

Esta especie posee hifas, septadas y ramificadas de las cuales se desarrollan conidióforos ramificados piramidales, con ramas cortas, que miden de 18- 25µm. A partir esta se desprenden conidios de paredes lisas, ovoides con aproximadamente de 2,8-3,2 x 2,5-2,8µm. Este hongo puede presentar como estructura de resistencia clamidosporas. (Samson, Hoekstra y Frisvad, 2004, pp. 210-240) .

1.7.5 Beneficios del hongo *Trichoderma spp*

La utilización de *Trichoderma spp* adquiere gran importancia por la reducción directa de residuos tóxicos en los suelos y aguas destinadas para el regadío. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo, planta, microorganismos, ambiente y repercuten de forma directa y positiva. En el crecimiento de las especies vegetales.(Salazar, 2017, p. 16).

1.7.6 Unidad formadora de colonias (UFC)

Las colonias se desarrollan después de un tiempo de incubación en un medio de cultivo, necesitan una temperatura adecuada para su crecimiento, se las determina mediante UFC (unidad formadora de colonia).(Velásquez *et al.*, 2009, pp. 1-10)

1.7.7 Condiciones de crecimiento

El desarrollo del *Trichoderma spp* está influenciado por diversos factores de tipo físico y nutricional, la temperatura óptima de crecimiento es de 25- 30°C, pero posee una capacidad de tolerancia a temperaturas entre 10-40°C. El pH óptimo de crecimiento es de 4 a 7. La humedad óptima crecimiento oscila entre 70-80 %, pero puede adaptarse a condiciones extremas de humedad de 20-90%. Este hongo puede tener una buena esporulación al ser expuesto a 3 minutos de luz o de 10-30 segundos de luz UV a 366nm. (Simkovic *et al.*, 2008; Cárdenas, 2010). En cuando a su nutrición necesita sustratos como amilasa, celulosa y peptina que las obtiene de la degradación enzimática, sus fuentes de carbono y nitrógeno, son los hidratos de carbono, ácidos

grasos y aminoácidos, urea, amoniaco y nitritos respectivamente. Además necesita de microelementos y vitaminas en cantidades tolerables. (Simkovic *et al.*, 2008; Torres, 2014).

1.7.8 *Modo de acción*

El hongo presentó un crecimiento micelial blanco durante los 3 primeros días de incubación, al quinto y sexto día se evidenció una esporulación total sobre la placa. Macroscópicamente presentó un micelio blanco, algodonoso y posteriormente una esporulación verde oliva de apariencia aterciopelada. (Cárdenas, 2010, p. 29).

1.7.9 *Determinación de la dosis Trichoderma spp*

En estudios recientes se determinó que la dosis comercial del *Trichoderma* es de 1 L (1×10^9 conidias ml^{-1}) en 200 litros según (Donoso, Lobos y Rojas, 2008, p. 3; Dobrosnki y Salazar, 2018, p. 12), por lo tanto se experimentó con esta dosis comercial para tratamientos de suelos. (Conrado *et al.*, 2004), menciona que la Biorremediación de los piretroides en suelo se debe a la enzimas difenil-dioxígeno oxidoreductasas que realiza la degradación en presencia de oxígeno.

1.7.10 *Curva de crecimiento*

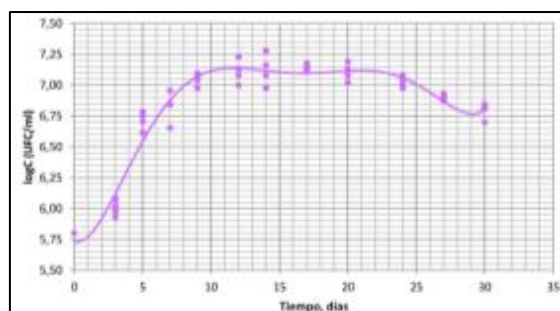


Figura 1-2 *Curva de crecimiento de los Trichoderma*

Fuente: (Poalacin.J, 2015, p. 57)

El *Trichoderma spp a* una dosis 2,5 ml/L, alcanza su máxima actividad enzimática, por lo tanto inicia su fase de latencia. (Flores *et al.*, 2009, p. 2).

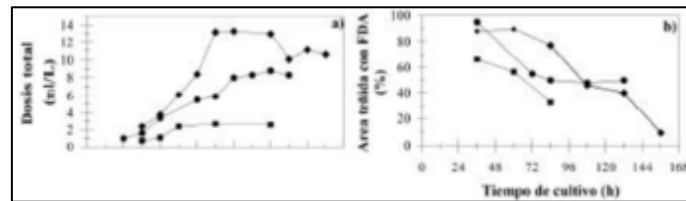


Figura 1-3 Curva de crecimiento del *Trichoderma*

Fuente: (Flores *et al.*, 2009, p. 2)

1.7.11 Cámara Neubauer

“Cámara Neubauer es una cámara de conteo, se utiliza para contar células bajo el microscopio. Consiste en una placa gruesa de cristal de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor y un cubre objetos. Las más comunes es la doble cámara, donde existen 2 zonas de conteo, una superior y la otra inferior, en la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular”(Raju, 2008).

1.7.12 Método de QuEChERS.

Es una técnica que permite análisis a los pesticidas, mediante 2 etapas: una etapa de extracción simple, y una fase de purificación. En la primera etapa se extrae analito mediante utiliza disolventes (sulfato de magnesio y cloruro de sodio). En la segunda etapa, la purificación consiste en eliminar agua y los agregados del analito mediante un adsorbente: PSA, C18, y carbón activo. (Lehotay y Ae Son, 2010).

1.7.13 Cromatografía de gases con detector selectivo de masas (MSD)

La cromatografía es una técnica permite detectar a las masas de las sustancias. Al introducir una muestra al cromatógrafo esta es transportada por una corriente de gas a través de una columna empacada con un sólido o una película de algún líquido. Debido a su efectividad de separar mezclas es considerada como la herramienta más importante en química. (Harris, 2003, p. 723).

CAPÍTULO 2

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Tipo y diseño de la investigación

2.1.1 *Por el tipo de investigación*

Aplicativa porque se realizó con un fin directo e inmediato. Se planteó determinar una dosificación de *Trichoderma* para tratar suelos contaminados con Piretroides, se escogió una plantación de fresas (*Fragaria vesca*) para realizar la experimentación.

2.1.2 *Por la temporalidad*

Transversal debido a que se recolectara muestras de suelo contaminado con Piretroides al inicio y al final de la experimentación, la cual durara 15 días, con los datos recolectados se realizará inferencia con respecto al porcentaje de remoción de los piretroides al aplicar la asociación de las cepas de *Trichoderma* spp, así también se realiza comparación para determinar cuál dosis suministrada de la asociación de las cepas de *Trichoderma* spp tuvo mejor efecto.

2.1.3 *Por el tipo de enfoque*

Cualitativo porque se recolectó datos sin medición numérica para describir las características morfológicas de la asociación de las cepas de *Trichoderma* spp.

Cuantitativo porque se recolectó datos durante el experimento donde se probó la hipótesis con base a una relación numérica y el análisis estadístico.

2.1.4 Por el diseño de investigación

La investigación fue Experimental.

2.2 Diseño experimental

En la presente investigación sobre la determinación una dosificación de *Trichoderma spp* para tratamiento de suelos contaminados con Piretroides, se lo realizó mediante un diseño experimental DCA (Diseño Completamente Azar), que consto de 3 tratamientos con 5 repeticiones y una unidad de control, obteniendo 16 unidades experimentales. Cada tratamiento correspondió a una dosis diferente de la Asociación de las cepas de *Trichoderma spp* (2,5 ml/L, 5 ml/l y 10 ml/l), cada unidad experimental tuvo una superficie de 1 m², mismos que fueron dispuestos aleatoriamente en un cultivo Fresa (*Fragaria vesca*).

Con los datos obtenidos durante el estudio se llevó a cabo un análisis estadístico con el programa InfoStat para validar la hipótesis planteada. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor, y la comprobación entre tratamientos mediante la prueba de TUKEY para los datos cuantitativos después de la confirmación de normalidad y homocedasticidad de los mismos.

Tabla 2-1 Tratamientos del Experimento

Dosis ml/L	Tratamiento	# Rotulo	# Columna	# Cama	Nomenclatura
Dosis 2,5	1	14	5	35	T1R1
	2	3	6	6	T1R2
	3	6	9	12	T1R3
	4	8	11	21	T1R4
	5	11	4	28	T1R5
Dosis 5	6	7	6	15	T2R1
	7	13	2	32	T2R2
	8	9	5	24	T2R3
	9	1	3	4	T2R4
	10	4	2	8	T2R5
Dosis 10	11	5	3	10	T3R1
	12	12	7	30	T3R2
	13	2	10	4	T3R3
	14	10	3	26	T3R4
	15	15	10	38	T3R5
Sin Dosis	16	16	2-5-2	7-18-41	Blanco

Dónde: **TR**: T: Dosis en *Trichoderma*, **R**: Numero de repeticiones

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

2.3 Unidad de Análisis

Las Unidades Análisis corresponden a las 16 muestras extraídas del suelo contaminado con Piretroides (Cypermctrina y Deltametrina), la extensión del cultivo de fresas de la cual se extrajo las muestras fue de 1680 m², cada muestra fue obtenida de una unidad experimental de 1 m², el cultivo se encuentra localizado en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia Huachi Grande, sector Sagrado Corazón de Jesús.

2.4 Población de estudio

Población estudio corresponde a la asociación de las cepa de *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* (T1), *Trichoderma hamatum* (T2), *Trichoderma koningii* (T3), y *Trichoderma sp.*(T4)), mismas que fueron obtenidas del laboratorio Artesanal de bioinsumos del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Dirección distrital de Tungurahua en convenio con la Corporación Organizaciones Agroproductivas del Cantón Ambato (COACA), la principal función de los hongos es la degradación de la Cypermctrina y de la Deltametrina en el suelo.

2.5 Tamaño de la Muestra

Tabla 2-2 Cálculo Tamaño de Muestra

NOMBRE	VARIABLE	DATO
Nivel de confianza	Z	1,89
% de la población deseada	p	95%
% de la población no deseada	q	5%
Tamaño Universo	N	672
Error de estimación máximo aceptable	e	10 %
Tamaño de muestra	n	16
% de confianza		94 %
Formula		$n = \frac{Z^2 * N * p * q}{e^2 * (N - 1) + (Z^2 * p * q)}$

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

El tamaño de muestra fue calculado con un porcentaje de confianza del 94 % y un error aceptable del 10 %, el cálculo determinó que se necesitan 16 muestras para el experimento como

lo demuestra la (Tabla 2-2), las muestras para analizar fueron extraídas del cultivo de fresa, tenía una superficie de 1680 m², las plantas estaban ubicadas mediante camas de 42 m de largo y 0,60 m de ancho , el número total de camas encontradas fueron 42, a su vez las camas fueron subdivididas en subunidades de 2,50 m de largo y 0,60 m de ancho, el número total subunidades calculadas fueron 672, luego se escogió 16 subunidades a partir de las 672 subunidades, mediante el método aleatorio se ubicó las 16 muestras en el cultivo misma que actuaran como unidades experimentales.

2.6 Selección de muestra

Mediante el método del zigzag, se asignó 10 puntos de muestreo en cada una de las unidad experimental, mediante un barreno se extrajo 100 g suelo en cada punto de muestreo a una profundidad de 0,25 cm. Se colocó 100 g de suelo en una funda ziploc para su pesaje, se realizó el mismo proceso en cada uno de los puntos de muestreo hasta obtener una muestra de 1kg, las muestras fueron analizadas por el laboratorio “LaboLab” para determinar presencia de Cypermetrina y Deltametrina. Se realizó el mismo proceso de selección muestra al inicio y al final del tratamiento, los datos obtenidos del análisis de laboratorio sirvieron para calcular el porcentaje de remoción del contaminante.

2.7 Hipótesis y especificación de variables

2.7.1 Hipótesis general

Hi: Una dosis comercial de 5 ml / L de la Asociación de las cepas de *Trichoderma* permite un porcentaje de remoción del 50 % para Cypermetrina y del 50 % para Deltametrina.

2.7.2 Variables

Dependiente: porcentaje de remoción de la asociación de las cepas de *Trichoderma spp.*

Independiente: dosificación de la asociación de las cepas de *Trichoderma spp.*

Intervinientes: temperatura, pH, humedad y conductividad.

2.8 Etapas de Investigación

La presente investigación se llevó a cabo en 3 etapas

2.8.1 Primera etapa: Identificación y caracterización del suelo del Cultivo de fresa

2.8.1.1 Georreferenciación y localización del Cultivo de fresas

El cultivo de fresa contaminado con Cypermetrina y Deltametrina se estableció su ubicación en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia de Huachi Grande, donde se ubicaron 4 puntos para georreferenciación mediante el sistema GPS (Anexo A), se obtuvieron datos de altura (m.s.n.m) y coordenadas (UTM).

Tabla 2-3 Puntos de Georreferenciación del cultivo de fresa

Puntos de Muestreo	Altura (m.s.n.m)	Coordenadas (UTM)	
		X	Y
P1	3028	761024	9854648
P2	3028	761072	9854673
P3	3028	761052	9854708
P4	3028	761004	9854683

Fuente: SALINAS Fabián ,2019

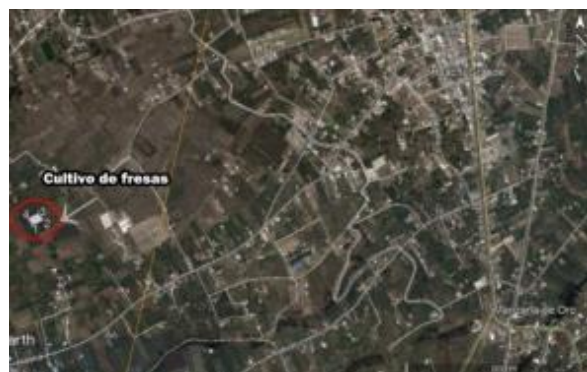


Figura 2-1 Localización del cultivo para Micorremediación

Fuente: Google Earth ,2019.

2.8.1.2 Localización y medición del área del cultivo de fresas

Se midió la extensión del cultivo, la cual fue de 1680 m². El ancho del cultivo fue 42m y su largo de 40 m. El lote se dividió en 42 camas de 0,60 m de ancho y de 40 m de largo, su espacio entre camas fue de 0,60 m. Con los puntos de georreferenciación se procedió a realizar un mapa de ubicación del cultivo. (Anexo A).

2.8.1.3 Delimitaciones de las unidades experimentales

Se determinó el área total del cultivo utilizando Argis y Civil cad, luego se dividió las 42 camas del cultivo en 672 subunidades de 1 m², su extensión fue de 2,50m de largo y 0,60m ancho. Mediante el programa Excel se empleó un método aleatorio para la selección de las 16 unidades experimentales a partir de las 672 subunidades de 1m². se localizó 16 unidades experimentales en el cultivo de fresa, se delimitó cada una de las unidades experimentales mediante estacas de 50 cm de largo y se las ató con una piola plástica. (Anexo D).

2.8.1.4 Caracterización del suelo cultivo de fresa

El suelo del sector tienen las siguientes características: textura franco-arenoso-limoso, profundidad de 1.0m, PH de 6.2, conductividad eléctrica de 6.9 meq/100g, sales solubles 0,26 mmhos/cm, 3% de materia orgánica, estableciendo que estas tierras son aptas para el establecimiento de huertos frutales y para el cultivo de la fresa.

Para caracterizar propiedades físicas y químicas el cultivo de fresa se tomó varias muestras del suelo mediante utilización de un barreno (25 cm de profundidad) cerca de las raíces de la fresa a una profundidad de 25 cm, el método utilizado para extraer las muestras del suelo fue el zigzag, en varios puntos muestreo se tomó aproximadamente 100 g, luego fueron colocadas en las fundas ziploc hasta pesar un 1kg y se mezcló uniformemente, finalmente se trasladó en un coolers con refrigerantes hasta el laboratorio de Análisis de Suelo de la Universidad Técnica Ambato

Facultad de Ciencias Agropecuarias. El reporte de los análisis de caracterización de suelo permitió determinar el estado del suelo antes de la contaminación con Piretroides y posterior a la aplicación de la asociación de las cepas de *Trichoderma spp*, Los parámetros físicos y químicos analizados fueron las siguientes:

Tabla 2-4 Parámetros analizados para caracterizar el suelo del cultivo de fresas

Parámetros analizados	Método	Equipo
PH	Electroquímico	PH/Conductímetro Orion 550A
C.E	Electroquímico	PH/Conductímetro Orion 550A
Textura	Bouyoucos	Licudo Bouyoucos
MO	Gravimetría	Balanza Analítica
N-total	KJELDAHL	KJELDAHL
Fosforo	Oisen Mod	Espectrofotómetro Genesys 20
K, Ca, Mg	Oisen Mod	Espectrofotómetro de AA Perkin Elmer 100
Fe, Cu, Mn, Zn	Oisen Mod	Espectrofotómetro de AA Perkin Elmer 100

Realizado por: BUENAÑO, Marcia, 2019

2.8.2 Segunda etapa: Obtención de cepas de *Trichoderma*

2.8.2.1 Descripción del Lugar

La asociación de las cepas del *Trichoderma spp* fueron reproducidas en el laboratorio artesanal de bioinsumos de la dirección distrital de Tungurahua del Ministerio de Agricultura y Ganadería, en convenio con la Corporación Organizaciones Agroproductivas del Cantón Ambato (COACA) ubicada en centro Agrícola Ambato, dirección Augusto Bonilla, Pablo Arturo Suárez. Se utilizaron cepas nativas de la provincia de Tungurahua que fueron aisladas por la Dirección Distrital de Tungurahua del ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Las especies a estudiar fueron: *Trichoderma harzianum* (T1), *Trichoderma hamatum* (T2), *Trichoderma koningii* (T3) y *Trichoderma sp* (T4).

2.8.2.2 Producción de las cepas de *Trichoderma*

El proceso de producción de las esporas de los hongos *Trichoderma harzianum* (T1), *Trichoderma hamatum* (T2), *Trichoderma koningii* (T3), y *Trichoderma spp* (T4). Consta de algunos subprocesos como: preparación del medio de cultivo a condiciones favorables para reproducción del hongo, la esterilización permite disminuir la contaminación microbiológica cruzada, la inoculación genera material genético, y en la incubación permite el desarrollo de las cepas. Luego de un tiempo se procede a cosechar, se realiza el conteo de esporas para determinar la concentración del producto, finalmente se almacena a temperaturas bajas. Si existe contaminación en el medio cultivo después se realiza el autoclavado a una presión de 1 atm y a Temperatura de 121°C por un tiempo de 30 minutos para garantizar la esterilización y muerte de agentes contaminantes.

Procedimiento de Preparación del medio de cultivo a base de agar patata dextrosa (PDA)

En la preparación del medio de cultivo PDA, es necesario pesar una cantidad determinada del agar, luego se lo diluye en agua destilada según las especificaciones del fabricante (39 g del medio en 1000 ml de agua destilada). Se calentó la mezcla en una botella pyrex de 400 ml hasta que alcance el punto de ebullición para disolverlo por completo, se recomienda agitar la mezcla para evitar que el medio se queme o se derrame. El siguiente proceso es la esterilización en autoclave durante 30 minutos a una presión de 1 atm y a una temperatura de 121 °C.

Se realizó la verificación del enfriado de la botella de pyrex con el medio de cultivo para evitar quemaduras durante su manipulación, luego la botella fue colocada en la cámara de siembra. Después se desinfecto los guantes mediante cloro 0,003 % y se encendió los mecheros de alcohol, las cajas Petri vacías fueron extendidas alrededor de los mecheros. Se destapó la botella con agar para flamearla por el mechero. Se procedió a abrir las cajas Petri y se dispuso el agar hasta alcanzar un espesor de 4mm +/- 1 mm evitando la formación de burbujas de aire. Finalmente se encendió la luz ultravioleta de la cámara de siembra hasta que se solidifique el agar durante una media hora aproximadamente para luego cerrarlas. (Anexo D).

Procedimiento de Resiembra en las cajas Petri

En el Proceso de Resiembra en las cajas Petri, se necesitó esterilizar la asa metálica mediante el flameado por el mechero, con mucho cuidado se abrió los vidales donde se encontraban las cepas y con la asa de siembra se recogió una muestra. Luego se abrió las cajas Petri para colocar la muestra de la cepa en centro del agar gelificado y se procedió a cerrar las cajas Petri donde se propagara el hongo. Las Cajas Petri fueron selladas con la cinta parafina para evitar la contaminación, se rotuló las cajas Petri como medida de identificación de las cepas sembradas. Luego se las colocó en las incubadoras a una temperatura fija de 22 °C aproximadamente. La observación del crecimiento diario del micelio y grado de contaminación se lo realizo a 7 días posteriores a la siembra, las cajas contaminadas fueron separadas para eliminarlas. Finalmente se esperó que el desarrollo del microorganismo se de en toda la caja Petri. (Anexo D).

Procedimiento de preparación del sustrato en las fundas de polietileno

Se realizó el pesaje de 1 kg de arroz clasificado ausente de contaminación, luego se lo dejo en remojo durante 5 minutos. Se necesitó revolver, lavar y escurrir el arroz para liberar el almidón, hasta que el agua de lavado salga transparente. Se precoció el arroz en una olla arrocera con 40 ml de agua, para que la cocción sea uniforme se mezcló continuamente el arroz, se depositó la preparación en un recipiente limpio y seco hasta que se enfrió. Se depositó los 100 g de arroz precocido en las fundas de polietileno, para evitar la contaminación al esterilizar las fundas fueron selladas con 2 dobleces y un nudo de amarre. Se esterilizo las fundas, luego fueron colocadas en la cámara de siembra (Anexo E).

Procedimiento de resiembra en las fundas polietileno

De las cajas Petri se extrajo una muestra de las cepas de *Trichoderma spp* mediante una asa de siembra esterilizada, se abrió el nudo de las Fundas polietileno y se colocó la muestra de la cepa al interior de las fundas polietileno. Luego se rotulo y se realizó 2 dobleces en las fundas polietileno con la ayuda del Masking se fijaron las mismas. Al existir grumos en la fundas

sembradas se procede a mezclar suavemente el inóculo hasta que el arroz cubra la muestra, la incubación de las fundas duró aproximadamente 15 días a una temperatura fija de 20 °C aproximadamente y a una humedad relativa del 50%. (Anexo F).

Proceso de Crecimiento de las cepas del *Trichoderma*

En el crecimiento de las cepas de *Trichoderma spp* se dejó las incubadoras semi-abiertas para evitar el aumento de la temperatura, el inóculo en las fundas necesitó de movimientos rotatorios uniformes para su propagación después de 5 días de siembra. Las fundas fueron depositadas en el área de cultivo para continuar con su crecimiento, su control se los realizo cada 2 días. Finalmente las fundas fueron clasificar de acuerdo a su cepa de origen. (Anexo F).

Procedimiento de Cosecha

Las fundas con mayor crecimiento fueron seleccionadas y clasificadas de acuerdo a su cepa de procedencia, se diluyo el cosechador específico de *Trichoderma* a una concentración de 50% en un vaso de precipitación de 10ml. Se colocó el contenido de la funda en un recipiente limpio y se lo desinfecto, se procedió a verter los 200 ml de la dilución del cosechador en el mismo recipiente se lo dejo en repose durante 20 min y luego se agitó la dilución con movimientos constantes. El líquido cosechado fue colocado en otro recipiente después de cernirlo, se devolvió el arroz con el producto al recipiente inicial y se colocó agua para revolver la dilución durante 10 minutos, finalmente se trasvació la dilución nuevamente, se repitió el proceso hasta obtener un líquido de color verde claro y con menor densidad. Finalmente se colocó el producto cosechado en un recipiente hermético. (Anexo F).

Procedimiento de Conteo de colonias.

Paso 1. Diluciones seriadas

Las diluciones seriadas son utilizadas para reducir la concentración de las esporas en relación a su concentración original, se lo realiza principalmente para en el conteo de número de colonias formadoras (UFC). En un vaso de precipitación de 100ml se tomó 50ml de cada una de las cepas

(T1, T2, T3, T4), luego se colocó 1ml del producto en 100ml de agua destilada se lo agitó hasta desprender todas las esporas, esta solución se denomina solución madre.

El siguiente paso fue poner 9ml de agua destilada en los tubos de ensayo rotulados con la siguiente codificación 10-1, 10-2, 10-3, 10-4 y 10-5, de la solución madre se tomó 1ml y se lo depositó en un tubo de ensayo, se lo agitó hasta homogenizarlo (10^{-1}). Se realizó el mismo proceso hasta que se obtuvo una dilución en la cual se puede contar los microorganismos (10^{-2}). La determinación UFC se lo realizó mediante una cámara de Neubauer. (Anexo F).

Paso 2. Preparación de la muestra en la Cámara Neubauer

Se tomó 10 μ l con una micropipeta y se colocó varias gotas de la dilución (10^{-2}) en la hendidura entre los dos compartimentos de la cámara de Neubauer. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara, en caso de que aparezcan burbujas o se mueva el cubreobjetos hay repetir el proceso.

Paso 3. Conteo de esporas en la Cámara Neubauer

El conteo de esporas en la cámara de Neubauer se lo realiza utilizando el microscopio, mediante el lente 4X se identifican las cámaras dobles, donde existen 2 zonas de conteo, una superior y la otra inferior, (hemisferio superior e inferior) en su parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular (.Anexo F)

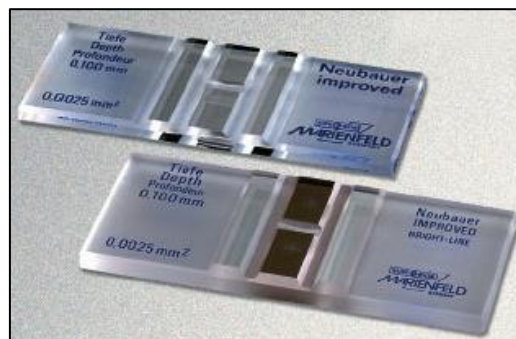


Figura 2-2 Cámara de Neubauer

Fuente:(Poalacin.J, 2015, p. 21)

Mediante el enfoque del lente 10X se identifica cada zona de conteo que es un cuadrado de 3 x 3 mm. La depresión de la cámara está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de tal forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste sea identificado desde la superficie. El cuadrado central se divide en 25 cuadros medianos de 0,2 mm dando un área individual de 0,04 mm², si se considera los dos hemisferios se obtiene un área total de 2 mm².

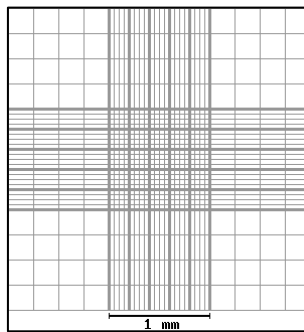


Figura 2-3 División de la zona centro

Fuente:(Torres, 2014, p. 34)

Mediante el lente 40X se identifica los cuadros medianos, que se subdividen en 16 cuadros pequeños, dando un total de 400 cuadros en cada hemisferio. Para el conteo en cada cámara se selecciona los 4 cuadros medianos ubicados en los ángulos externos y también el cuadro central (figura 7). También se cuentan los conidios que se encuentran tocando la primera de las tres líneas que circundan el cuadrado. Se contaron en total 10 cuadros, cinco en campo 1 y cinco en campo 2, se procedió a calcular el número de conidios por ml (Concentración).

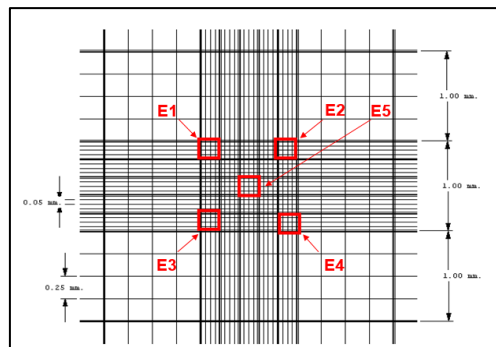


Figura 2-4 Cuadros de Conteo de esporas

Fuente: (Torres, 2014, p. 33)

Tabla 2-5 Concentración de las esporas del producto

Concentración UFC/ml	# esporas Cámara 1	# esporas Cámara 2
1,08E+08	19	24

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

Tabla 2-6 Concentración de esporas por cepa

Cepa	Concentración UFC/ml	# esporas Cámara 1	# esporas Cámara 2
<i>Trichoderma harzianum T-1</i>	2,50E+08	5	5
<i>Trichoderma hamatum T-2</i>	2,75E+08	5	6
<i>Trichoderma koningii T-3</i>	2,25E+08	6	7
<i>Trichoderma spp T-4</i>	2,75E+08	3	6

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

Cálculo para determinar el número de esporas del producto

$$C = \frac{Ne * Nc * 1000}{A * cm * A * D} \quad (1)$$

C= Concentración de esporas

Ne= # esporas contadas

Acm= área de los cuadrados medianos

Nc= # de cuadrados contados

A= Profundidad de la cámara

$$C = \frac{(18 + 24) \text{ esporas} * 10}{0,2 \text{ mm} * 0,2 \text{ mm} * 0,1 \text{ mm} * 1 * 10^{-1}}$$

$$C = \frac{1050000 \text{ UFC}}{\mu\text{L}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{\text{ml}}$$

$$C = 1,05 * 10^{-1} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}}$$

Procedimiento de envasado

Se encendió los mecheros de alcohol para evitar contaminaciones ambientales, se sacó el producto del envase hermético del proceso de cosechado y se tomó 500 ml de cada cepas (T1, T2, T3 y T4), luego se realizó el contaje de las esporas de cada cepa de *Trichoderma spp*; finalmente el producto fue mezclado y envasado en botella hermético. (Anexo F).

2.8.3 Tercera etapa: Trabajo en Campo

2.8.3.1 Identificación las unidades experimentales

Mediante un sorteo aleatorio, se ha signó a cada unidad experimental uno de los 16 tratamientos, se elaboraron letreros de identificación para cada una de las unidades experimentales de acuerdo al tratamiento asignado y se calculó la cantidad de tierra a contaminarse.

Cálculo de Kilogramos de Tierra Contaminados con Piretroides

$$Kg = \delta * A * P \quad (1)$$

Dónde:

Kg = Kilogramos Contaminados

δ =Densidad del Suelo

A= Área de las unidades experimentales

P=Profundidad de muestra

$$Kg = 18 \text{ m}^2 * 0,25 \text{ m} * 900 \text{ kg/ m}^3$$

$$Kg = 4050 \text{ kg}$$

2.8.3.2 Aplicación de la Cypermetrina y de la Deltametrina

Se calculó concentración de los contaminantes a partir de la cantidad suelo a utilizarse de 4050 kg, se preparó una solución de Deltametrina y Cypermetrina en un tanque 200 litros para el control de araña roja (*Tetranychus urticae* Koch), el inyector manual fue calibrado para una profundidad de 25 cm, mediante la utilización de una bomba de fumigación se inyectó la solución cerca de raíces de planta a una profundidad de 0,25m. Se realizó el mismo proceso en todas las unidades experimentales. Finalmente se Esperó 48 horas para ingresar al área tratada.

Tabla 2-7 Dosis aplicadas de la Cypermetrina y Deltametrina

Producto	Ingrediente Activo	Dosis (200 L	Tiempo de Carencia
Ramber	Cypermetrina	350ml/L	16 días
Decis	Deltametrina	250 ml/L	14 días

Fuente:(Bayer CropScience, 2015)

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

Cálculo de la Concentración De los Piretroides

$$Dosis = \frac{Vp}{Vd} \quad (1)$$

Dónde:

Vp = Volumen producto

Vd =Volumen de dilusión

$$Dosis = 350 \text{ ml} / 200 \text{ L}$$

$$Dosis = 1,75 \frac{\text{ml}}{\text{L}}$$

Cálculo de la Concentración De los Piretroides en un kilogramo se suelo

$$CB = \frac{KgB*CA}{KgA} \quad (2)$$

Dónde:

CA= Concentración inicial

KgA=Kilogramos inicial

CB= Concentración final

KgB=Kilogramos Final

$$CB = \frac{1,75 \frac{ml}{l} * 1Kg}{4050 Kg}$$

$$CB = 4,32E-04 \frac{ml}{l}$$

$$CB = 4,32E-04 \frac{ml}{l} * 1000 \frac{mg}{Kg}$$

$$CB = 0,432 \frac{mg}{Kg}$$

Tabla 2-8 Dosis calculadas de Cypermetrina Y Deltametrina

Ingrediente Activo	Dosis 200 L En 4050 Kg	Dosis 1 L En 1 kg	Dosis 1 L En 1 kg
Cypermetrina	1,75 ml/L	4,32E- 04 ml/L	0,432 mg/kg
Deltametrina	1,25 ml/L	3,08E- 04 ml/l	0,308 mg/ kg

Fuente:(Bayer CropScience, 2015)

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

2.8.3.3 *Recolección de las muestras iniciales*

Después de 2 días de la fumigación se recogió las muestras del suelo mediante la utilización de un barreno de 25 cm de profundidad) cerca de las raíces donde se inyectó la solución del contaminante a una profundidad de 25 cm, se tomó las muestras en varios puntos de la unidad experimental; luego las muestras fueron depositadas en las fundas ziploc hasta pesar un 1kg y se procedió a mezclar uniformemente, se realizó el mismo proceso en todas las unidades experimentales. Finalmente se rotuló y se trasladó las muestras en los coolers con refrigerante hasta el laboratorio de Análisis Alimentos, Aguas y Afines “Labolab” (.Anexo G).

2.8.3.4 Aplicación de las dosis de *Trichoderma spp* en el suelo

Se realizó el cálculo para determinar las 3 dosificaciones utilizadas en la Aplicación. Se preparó una solución de 40 litros por cada una de las dosis seleccionadas, la cual contienen las cepas *Trichoderma*, el inyector manual fue calibrado para una profundidad de 25 cm, mediante la utilización de una bomba de fumigación se inyectó la solución en los mismos puntos donde se realizó la contaminación cerca de la raíz de planta a una profundidad de 25 cm. Se realizó el mismo proceso en todas las unidades experimentales. Se esperó 8 días para continuar con la aplicación, se realizó en mismo proceso con la segunda aplicación del tratamiento. (Anexo G).

Cálculo para determinar la dosis de *Trichoderma spp*

$$CB = \frac{VB * CA}{VA} \quad (2)$$

Dónde:

CA= Concentración inicial

VA=Volumen inicial

CB= Concentración final

VB=Volumen Final

$$C = \frac{2,5 \frac{ml}{l} * 40 L}{1L}$$

$$C = 100 \frac{ml}{l}$$

Tabla 2-9 Dosificaciones utilizadas

Dosis 1L	Dosis 40 L
2,5 ml	100 ml
5 ml	200 ml
10 ml	400 ml

Realizado: SALINAS Fabián ,2019

Fuente: (Flores *et al.*, 2009, p. 2)

2.8.3.5 Recolección de las muestras finales

La recolección de las muestra de suelo se realizó un día antes que finalice el tiempo de residencia de la Cypermotrina y la Deltametrina en el cultivo fresa. El tiempo de residencia de Piretroides es de aproximadamente 15 días, se utilizó un barreno de 25 cm de profundidad para tomar las muestras del suelo cerca de las raíces donde se inyectó la solución del contaminante .se tomó las muestras en varios puntos, luego las muestras fueron colocadas en las fundas ziploc hasta pesar un 1kg y se procedió a mezclar uniformemente, se realizó el mismo procesos en todas las unidades experimentales. Finalmente se rotulo y se trasladó las muestras en los coolers con refrigerante hasta el laboratorio de Análisis Alimentos, Aguas y Afines “Labolab”. (Anexo G).

2.8.3.6 Análisis de laboratorio

Se utilizó el Método EPA 1699 para la determinación de compuestos organoclorados, organofosforados, triazina y plaguicidas piretroides en muestras ambientales por espectrometría de masas /alta resolución cromatografía de gases de alta resolución (HRGC / HRMS) usando la dilución de isótopos y las técnicas de cuantificación de patrón interno. Este método EPA se aplica generalmente a medios líquidos, sólidos y tejidos.

CAPÍTULO 3

3 MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Primera etapa: Identificación y caracterización del suelo del Cultivo de fresa

Se localizó el Cultivo de fresa, mediante el Sistema GPS, se seleccionó 4 puntos representativos del Terreno, se estableció su ubicación en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia de Huachi Grande, sector Sagrado Corazón de Jesús, mediante el programa informática Argis se elaboró un mapa de ubicación (Anexo A). El área total del cultivo fue 1680 m², en la plantación se encontraba 42 camas de 40 m de largo y 0,60 m de ancho; las 16 las unidades de análisis tenían las siguientes dimensiones 2,50 m de largo y 0,60 m de ancho.

Para caracterizar las propiedades físicas y químicas del suelo del cultivo de fresa se tomó varias muestras del suelo mediante utilización de un barreno (25 cm de profundidad) cerca de las raíces de la fresa a una profundidad de 25 cm, el método utilizado para extraer las muestras del suelo fue el zigzag, en varios puntos de muestreo se tomó aproximadamente 100 g. Luego fueron colocadas en las fundas ziploc hasta pesar un 1kg y se mezcló uniformemente, finalmente se trasladó en un cooler con refrigerante hasta el laboratorio de Análisis de Suelo de la Universidad Técnica Ambato Facultad de Ciencias Agropecuarias.

La toma de muestra de suelo para el análisis de la caracterización, se lo realizó ante de la contaminación con piretroides y al final del tratamiento posterior a la aplicación de la asociación de las cepas de *Trichoderma spp.* El reporte de los análisis generó resultados de caracterización de las propiedades físicas y químicas del suelo antes del tratamiento y posterior al tratamiento.

Tabla 3-1 Reporte de los parámetros para la caracterización del suelo

Parámetros Analizados	Unidad	Análisis Antes del tratamiento	Análisis después del tratamiento	Nivel
PH		7,48	7,60	Neutro
C.E	Mmhos/cm	0,3	0,3	No Salino
Textura	Arena / limo			
	Arcilla	2,5	3	Bueno
	M.O %			
N-total	ppm	19	14	Bueno
P	ppm	81	78	Alto
K	meq/ 100 g	1,2	1,0	Alto
Ca,	meq/ 100 g	7	7	Alto
Mg	meq/ 100 g	1,5	1,3	Alto
Cu	ppm	5	4	Alto
Mn	ppm	15	12	Medio
Zn	ppm	4	3	Medio
Ca/Mg	meq/ 100 g	5	5	Optimo
Mn/k	meq/ 100 g	1	1	Bueno
Ca +Mg/k	meq/ 100 g	7	6	Bueno

Realizado por: BUENANO, Marcia, 2019

Análisis de calidad del suelo para el tratamiento de las cepas de *Trichoderma*

Análisis

Las principales propiedades fueron analizadas al inicio y al final del tratamiento con las cepas de *Trichoderma spp*, permitieron categorizar al suelo como: franco-arenoso-limoso, este tipo de textura es ideal para la producción agrícola, los principales parámetros que permitieron determinar la calidad del suelo fueron: pH, porcentaje de materia orgánica, cantidad de microelementos, conductividad eléctrica y cantidad de nitrógeno. Para evidenciar las modificaciones de los parámetros del suelo durante el tratamiento, se realizó la comparación del análisis inicial y del análisis final, los resultados generados fueron los siguientes : el pH inicial fue de 7,48 y pH final fue de 7,60 por lo tanto se obtuvo un suelo neutro en el experimento y el porcentaje de la materia orgánica se mantuvo en 3 % en todo el tratamiento.

Al comparar la cantidad de los microelementos en el análisis inicial (81 ppm de P, 5 ppm Cu, 12 ppm de Mn, 3 ppm de Zn, 1,2 meq/100g de K, 7 meq/100g de Ca y 1,5 meq/100g de Mg), con la cantidad de los microelementos del análisis final (78 ppm de P, 4 ppm Cu, 15 ppm de Mn, 4 ppm de Zn, 1,0 meq/100g de K, 7 meq/100g de Ca y 1,3 meq/100g de Mg), se evidenció un consumo de microelementos por parte de las hongos al insertarlos en el cultivo. La conductividad eléctrica se mantuvo en 0,3 mmhos/cm, por lo que consideró que los compuestos salinos no inhibieron en el crecimiento de las cepas y la cantidad de nitrógeno inicial fue de 19 ppm y la cantidad nitrógeno final fue de 14 ppm, lo que indica que las bacterias necesitan de nitrógeno para su crecimiento, se considerado al nitrógeno como la principal fuente de nutrientes de la especie *Trichoderma spp.*

Discusión

El análisis de laboratorio de la (Tabla 3-1), permitió comparar los resultados inicial y final, considerando que no existe diferencia significativa entre ambos. El pH del suelo obtuvo un valor inicial de 7,48, se contrastó con los estudios de (Simkovic *et al.*, 2008; Cárdenas, 2010), por lo que al pH del suelo se lo categorizó neutro ideal para la propagación del hongo *Trichoderma spp.*, El pH final del estudio aumentó a 7,60, por lo no existió tanta diferencia. El porcentaje de materia orgánica se mantuvo en 3 % considerados como un porcentaje bajo para reproducción de hongos, El tiempo persistencia Cypermetrina y Deltametrina en suelo fue de 16 días esto se debió a la baja cantidad de materia orgánica, por lo tanto tiempo de persistencia y cantidad de materia orgánica están relacionados directamente, a mayor contenido de materia mayor será su fijación, eso concuerda con (Wadhwa *et al.*, 2010), en donde mencionó que la Cypermetrina se degradaba con facilidad en suelo con baja cantidad de materia orgánica, permitiendo así disminuir su tiempo de persistente en el suelo.

La textura reportada en el análisis de suelo fue franco-arenoso-limoso, se comparó con el Plan de Ordenamiento Territorial (GAD Huachi Grande, 2015) en donde menciona que los suelos francos-arenosos de la zona son los ideales para el cultivo de fresa. Los microelementos en suelo obtuvieron los siguientes valores: 81 ppm de P, 5 ppm Cu, 15 ppm de Mn, 4 ppm de Zn, 1,2 meq/100g de K, 7 meq/100g de Ca y 1,5 meq/100g de Mg, por lo tanto el hongo disponía de nutrientes para su desarrollo. La conductividad eléctrica fue 0,3 mmhos/cm, se puede


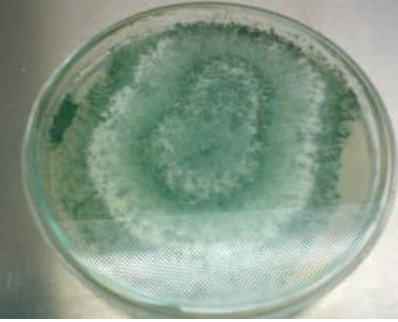
considerar que no existió presencia de sales que puedan inhibir la esporulación. La cantidad de nitrógeno total inicial fue de 19 ppm y cantidad final 14 ppm, generando un consumo de la fuente de nitrógeno por parte del hongo, como lo menciona (Simkovic *et al.*, 2008; Torres, 2014) el nitrógeno es principal fuente de nitrógeno de la especie *Trichoderma spp.*

3.1.1 Análisis microbiológico del suelo

En los estudios microbiológicos realizados por (Paucar, Díaz y Alvarado, 2011) menciona que los suelos de la sierra ecuatoriana se encontraron mayor cantidad de actinomicetos con $6,84 \times 10^7$ (UFC/g), seguidos por bacterias ($2,30 \times 10^6$ UFS/g) y por último los hongos con $2,71 \times 10^4$ UFC/g esto concuerda lo mencionado por (Olalde y Aguilera, 1998) que la bacteria más abundantes en suelo, seguido por los actinomicetos y luego por los hongos (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*).

3.2 Segunda etapa: Obtención de cepas de *Trichoderma spp.*

Tabla 3-2 Características macroscópicas de la cepa de *Trichoderma spp.*




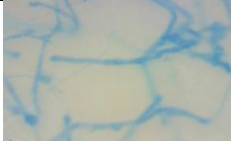
Laboratorio	Referencia Bibliográfica
	
Fuente: SALINAS, Fabián ,2019	Fuente: (Torres, 2014)

Realizado por: SALINAS, Fabián ,2019

Analizando la .Tabla 3-2, la imagen de la columna de la izquierda pertenecen a los resultados obtenidos en laboratorio, las cajas Petri los 8 días de incubación a 22 °C, presento un crecimiento micelial de color blanco, de textura algodónada en forma de anillos concéntricos y presenta esporas de color verdoso hasta llegar a un verde total con una textura aterciopelas, estas características fueron comparadas con la columna de la derecha (Torres, 2014, p. 43) que

describe las características macroscópicas del hongo como son: los micelios blancos algodonados y esporas de color verde y no se observa presencia de estructuras de resistencia o en relación a los estudios de (Samson, Hoekstra y Frisvad, 2004, pp. 210-240) que existe estructuras de resistencia.

Tabla 3-3 Características Microscópicas de la cepa de *Trichoderma*.

Laboratorio	Referencia Bibliográfica
 <p data-bbox="432 752 759 786">Fuente: SALINAS, Fabián ,2019</p>	 <p data-bbox="919 752 1142 786">Fuente: (Torres, 2014)</p>
 <p data-bbox="432 954 759 987">Fuente: SALINAS, Fabián ,2019</p>	 <p data-bbox="919 954 1142 987">Fuente: (Torres, 2014)</p>

Realizado por: SALINAS, Fabián ,2019

La imagen de la columna de la izquierda pertenecen a los resultados obtenidos en laboratorio durante 8 primeros días de la reproducción del hongo en las cajas Petri (Tabla 3-3), se encontraron hifas con características septadas. Los conidióforos tiene una forma piramidal las cuales se ramifican en ramas más cortas, no se observó presencia de clamidosporas, los análisis fueron comparadas con la columna de la derecha estudios obtenidos de (Torres, 2014, p. 43) que describe las características microscópicas del hongo mismos resultados tienen relación con las comparaciones realizadas por (Samson, Hoekstra y Frisvad, 2004, pp. 200-210), por tanto se determinó que las cepas corresponden a *Trichoderma spp*.

3.2.1 *Conteo de esporas y determinación de Dosificación*

En la Tabla 2-6 se describió el número esporas (UFC) correspondiente a cada cepa, contenidas en 1 ml del producto comercial, la cantidad de esporas contenidas en el producto analizado fue de 1,02E+09 UFC/ml correspondiendo al 100% de la concentración, estos resultados se contrastaron con la concentración de 1,00E+09 UFC/ml del estudio de (Donoso, Lobos y

Rojas, 2008, p. 3; Dobrosnki y Salazar, 2018, p. 12), la cepa T3 (*Trichoderma koningii*) generó la concentración más baja de $2,25E+08$ UFC/ml correspondiendo al 22 % de la concentración del producto, seguidos de la cepa T1 (*Trichoderma harzianum*) generó la concentración intermedia de $2,50E+09$ UFC/ml correspondiendo al 24 % de la concentración del producto, finalmente la cepa T2 (*Trichoderma hamatum*) y la cepa T4 (*Trichoderma spp*) generaron la concentración más alta de $2,75E+09$ UFC/ml correspondiendo al 27% de la concentración del producto, se concluyó que la diferencia de concentración de cada cepa en el producto oscila entre 1% al 3 % siendo poco significativo al momento de la aplicación del producto .

Tabla 3-4 Conteo de esporas



Realizado por: SALINAS, Fabián ,2019

3.3 Caracterización y dosificación de los Piretroides

Análisis

La dosis que se suministró de Cypermctrina fue de 350 ml y de Deltametrina fue de 250 ml, esta dosificación fue la recomendada por los almacenes de agroquímicos, los piretroides tienden a almacenarse en la corteza de frutos, al ser ingeridos por el ser humano pueden causar afectaciones a nivel sistema nervioso. Los piretroides se consideran como sustancias de persistencia moderada, debido a que se degradan rápidamente durante los primeros días, por la intervención de la luz solar o agua, pero ciertos estudios demuestran que pequeñas trazas de Piretroides pueden permanecer durante 6 meses en el suelo, su fijación al suelo depende de la cantidad materia orgánica presente el suelo, a menor cantidad materia orgánica menor será su fijación.

La densidad del suelo estudiado corresponde a 900 Kg/ m^3 , el área total de las unidades experimentales fue de 18 m^2 la profundidad para la toma de muestra fue de $0,25 \text{ m}$, con esta información se determinó la cantidad de Kilogramos a contaminarse con Cypermctrina y Deltametrina en las unidades experimentales, la cantidad de Kilogramos a contaminarse en el suelo correspondieron a 4050 kg . Luego se calculó la concentración del producto para un volumen de 200 L de disolvente, para la Cypermctrina fue de $1,75 \text{ ml / L}$ y para la Deltametrina fue de $1,25 \text{ ml/ L}$, una vez obtenidas las concentraciones se procedió a contaminar los 4050 kg de suelo. Finalmente se estimó la concentración de cada uno de los Piretroides contenidos en un kilogramo de suelo para la Cypermctrina fue de $4,32\text{E-}04 \text{ ml/L}$ y para la Deltametrina fue de $3,08\text{E-}04 \text{ ml/L}$, se procedió a transformar la concentración de ml/ L a mg/Kg para ponerlos a comparar con los datos obtenidos en el laboratorio y los límites permisibles. Para la Cypermctrina fue de $0,432\text{mg/Kg}$ y para la Deltametrina fue de $0,308 \text{ mg/Kg}$, los cuales fueron muy superiores a los límites permisibles de $0,05 \text{ mg/kg}$.

Discusión

En el presente estudio se observó que la acelerada remoción de los piretroides durante los primeros días, se generó por la intervención de un nivel elevado de precipitación, el cual fue de $13,9 \text{ mm}$ y el valor de la humedad relativa fue del 83% , esto permitió establecer la incidencia directa de la precipitación sobre el experimento. Se consideró que la principal forma de remoción natural de los piretroides es por infiltración cuando se tienen una alta intensidad de precipitación, pero la concentración removida por infiltración puede ocasionar contaminación de los ríos subterráneos esto concuerda con lo mencionado por (INIAP, 2002, p. 120), en donde la infiltración y la escorrentía son considerados como una de las formas de dispersar a los contaminantes a otros medios agravan la problemática de contaminación.

3.4 Comportamiento de *Trichoderma spp* en el suelo

Tabla 3-5 Parámetros para determinar el comportamiento del *Trichoderma spp*

Parámetro	Valor
Precipitación	13,3 mm
Temperatura de remediación	25 °C
Porcentaje de materia organica	3 %
Humedad relativa del suelo	87 %
PH del suelo en tratamiento	7,60
Porcentaje de consumo Micronutrientes	14 %
Precio de litro de Cepa de <i>Trichoderma</i>	13,50 \$

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Análisis

En cuando al Análisis de laboratorio (Tabla 3-1), se determinó que el suelo del cultivo es apto para producción agrícola, sin embargo sus características afectaron a la reproducción de las cepas de *Trichoderma spp* en el suelo, se consideró a la precipitación, porcentaje materia orgánica, porcentaje de consumo micronutrientes y al pH como los principales factores causantes de esta afectación, las mediciones realizadas durante el estudio permitieron elaborar la (Tabla 3-5).donde es evidencia que la precipitación de 13,3 mm fue muy elevada y produjo 87 % de humedad en suelo permitiendo así una pérdida de las cepas por efecto de arrastre de infiltración, esto concuerda con los estudios realizados por (Simkovic *et al.*, 2008; Cárdenas, 2010) en donde menciona que al tener condiciones extremas de humedad pueden afectar al desarrollo de las cepas de los hongos.

En cuando a la cantidad materia orgánica en el suelo se obtuvo 3%, por lo tanto se consideró como deficiente para la propagación de hongos en el suelo, debido a que este parámetro permite la adherencia del hongo al suelo. Esto concuerda con el estudio (Wadhwa *et al.*, 2010) donde menciona que la persistencia de sustancias químicas y de organismos vivos en el suelo están relacionados directamente materia orgánica, es decir al tener una escasas de este parámetro disminuyendo el tiempo de persistente de los agregados en el suelo.

Los micronutrientes consumidos por las cepas de *Trichoderma spp* fue del 13,3 % , por lo tanto existe un aprovechamiento de los nutrientes para el crecimiento fúngico, las cantidades

encontrada de microelementos como fósforo inicialmente fue de 81 ppm y se redujo a 78 ppm, en cambio el potasio se redujo de 1,2 meq/100g a 1,0 meq/100g, si mencionamos al calcio se mantuvo en 7 meq/100g. La cantidad de nitrógeno encontrada inicialmente fue de 19 ppm se redujo a 14 ppm, su principal fuente de obtención son: ácidos grasos y aminoácidos, urea, amoníaco y nitritos respectivamente. Según, (Simkovic *et al.*, 2008; Torres, 2014) el NaCl y KCl a concentraciones altas puede inhibir la esporulación fúngica.

La cantidad de microelementos y nutrientes que se encontró en el suelo fue muy baja para el crecimiento del hongo *Trichoderma spp*, esto generó una competencia por nutrientes entre las cepas de *Trichoderma spp*, por lo tanto las cepas que sobrevivieron generaron la enzima difenil-dioxígeno oxidoreductasas para la remoción de los Piretroides. Esto concuerda con los estudios (De Luccas A, 2007). En donde señala que los hongos al existir escasos de nutrientes generan competencia.

3.5 Análisis estadístico

Tabla 3-6. Degradación de la Cypermctrina

	Repetición	Concentración De partida (mg/kg)	Concentración Inicial del Tratamiento (mg/kg)	Concentración Final del tratamiento (mg/kg)	Concentración degradada sin tratamiento (mg/kg)	Diferencia (mg/kg)
TO (0ml/L)	Blanco	0,432	0,141	0,037	0,291	0,104
T1 (2,5ml/L)	R1	0,432	0,285	0,004	0,147	0,281
	R2	0,432	0,12	0,027	0,312	0,09
	R3	0,432	0,118	0,071	0,314	0,047
	R4	0,432	0,114	0,096	0,318	0,018
	R5	0,432	0,199	0,01	0,233	0,189
T2 (5 ml/L)	R1	0,432	0,134	0,092	0,298	0,042
	R2	0,432	0,056	0,009	0,376	0,047
	R3	0,432	0,09	0,02	0,342	0,07
	R4	0,432	0,003	0,0005	0,429	0,0025
	R5	0,432	0,069	0,02	0,363	0,049
T3 (10ml/L)	R1	0,432	0,085	0,013	0,347	0,072
	R2	0,432	0,207	0,056	0,225	0,151
	R3	0,432	0,238	0,125	0,194	0,113
	R4	0,432	0,08	0,036	0,352	0,044
	R5	0,432	0,029	0,015	0,403	0,014
	Repetición	% sin Remoción (%)	Diferencia de Concentración (mg/kg)	Diferencia de Concentración (%)	Porcentaje de Remediación (%)	TOTAL
TO (0ml/L)	Blanco	67,36%	0,104	24,07%	8,56%	100,00%
T1 (2,5ml/L)	R1	34,03%	0,281	65,05%	0,93%	100,00%
	R2	72,22%	0,09	21,53%	6,25%	100,00%
	R3	72,69%	0,047	10,88%	16,44%	100,00%
	R4	73,61%	0,018	4,17%	22,22%	100,00%
	R5	53,94%	0,189	43,75%	2,31%	100,00%
T2 (5 ml/L)	R1	68,98%	0,042	9,72%	21,30%	100,00%
	R2	87,04%	0,047	10,88%	2,08%	100,00%
	R3	79,17%	0,07	16,20%	4,63%	100,00%
	R4	99,31%	0,0025	0,58%	0,12%	100,00%
	R5	84,03%	0,049	11,34%	4,63%	100,00%
T3 (10ml/L)	R1	80,32%	0,072	16,67%	3,01%	100,00%
	R2	52,08%	0,151	34,95%	12,96%	100,00%
	R3	44,91%	0,113	26,16%	28,94%	100,00%
	R4	81,48%	0,044	10,19%	8,33%	100,00%
	R5	93,29%	0,014	3,24%	3,47%	100,00%

Realizado por: SALINAS, Fabián

Tabla 3-7. Degradación de la Deltametrina

	Repetición	Concentración De partida (mg/kg)	Concentración Inicial del Tratamiento (mg/kg)	Concentración Final del tratamiento (mg/kg)	Concentración degradación sin tratamiento (mg/kg)	Diferencia (mg/kg)
TO (0ml/L)	Blanco	0,308	0,141	0,037	0,167	0,104
T1 (2,5ml/L)	R1	0,308	0,269	0,003	0,039	0,266
	R2	0,308	0,093	0,012	0,215	0,081
	R3	0,308	0,085	0,049	0,223	0,036
	R4	0,308	0,074	0,06	0,234	0,014
	R5	0,308	0,153	0,007	0,155	0,146
T2 (5 ml/L)	R1	0,308	0,123	0,065	0,185	0,058
	R2	0,308	0,027	0,004	0,281	0,023
	R3	0,308	0,062	0,023	0,246	0,039
	R4	0,308	0,002	0,0005	0,306	0,0015
	R5	0,308	0,043	0,009	0,265	0,034
T3 (10ml/L)	R1	0,308	0,051	0,012	0,257	0,039
	R2	0,308	0,19	0,028	0,118	0,162
	R3	0,308	0,153	0,082	0,155	0,071
	R4	0,308	0,045	0,016	0,263	0,029
	R5	0,308	0,018	0,015	0,29	0,003
	Repetición	Porcentaje sin Remoción (%)	Diferencia de Concentración (mg/kg)	Diferencia de Concentración (%)	Porcentaje de Remedación (%)	TOTAL
TO (0ml/L)	Blanco	54,22%	0,104	33,77%	12,01%	100,00%
T1 (2,5ml/L)	R1	12,66%	0,266	86,36%	0,97%	100,00%
	R2	69,81%	0,081	26,30%	3,90%	100,00%
	R3	72,40%	0,036	11,69%	15,91%	100,00%
	R4	75,97%	0,014	4,55%	19,48%	100,00%
	R5	50,32%	0,146	47,40%	2,27%	100,00%
T2 (5 ml/L)	R1	60,06%	0,058	18,83%	21,10%	100,00%
	R2	91,23%	0,023	7,47%	1,30%	100,00%
	R3	79,87%	0,039	12,66%	7,47%	100,00%
	R4	99,35%	0,0015	0,49%	0,16%	100,00%
	R5	86,04%	0,034	11,04%	2,92%	100,00%
T3 (10ml/L)	R1	83,44%	0,039	12,66%	3,90%	100,00%
	R2	38,31%	0,162	52,60%	9,09%	100,00%
	R3	50,32%	0,071	23,05%	26,62%	100,00%
	R4	85,39%	0,029	9,42%	5,19%	100,00%
	R5	94,16%	0,003	0,97%	4,87%	100,00%

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

3.5.1 Porcentaje de Remoción de la Cypermctrina sin tratamiento

Tabla 3-8 Análisis de la varianza % de Remoción sin tratamiento de la Cypermctrina

Análisis de la varianza % de Remoción sin tratamiento de la Cypermctrina					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Porcentaje de Remoción sin Tr..	16	0,27	0,09	23,61	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1288,22	3	429,41	1,51	0,2630
TRATAMIENTO	1288,22	3	429,41	1,51	0,2630
Error	3420,93	12	285,08		
Total	4709,15	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=44,83553
Error: 285,0777 gl: 12

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
2,5ml/L	61,30	5	7,55	A
Blanco	67,36	1	16,88	A
10ml/L	70,42	5	7,55	A
5ml/L	83,70	5	7,55	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Treatment	Mean (%)	n	E.E.
Blanco	67,36	1	16,88
2,5ml/L	61,30	5	7,55
10ml/L	70,42	5	7,55
5ml/L	83,70	5	7,55

Fuente: Infostat, 2019

Tabla 3-9 Análisis de varianza del % de Remoción Sin tratamiento Tukey al 5%

Coeficiente de Variación	Significancia	Medias % y Rangos			
		T0 Suelo + Piretroide	T1 Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma	T2 Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma	T3 Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma
23,61	**	67,36 A	61,30 A	83,70 A	70,42 A

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Análisis

Según la Tabla 3-9 se observa que el coeficiente de variación es de 23,61% y se determina que los datos son confiables, porque se encuentra dentro de los valores permitidos para este tipo de ensayos experimentales. El ANOVA muestra una significancia estadística baja lo que indica que ningún tratamiento es diferente. La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo a Tukey al 5% establece que las medias de T0, T1, T2 y T3 son iguales al ubicarse en el mismo rango A, los valores de las medias del % de remoción sin tratamientos genero el siguientes resultado: T0 con un valor de 67,36 %, T1 con un valor de 61,30 %, T2 con un valor de 83,70 % y T3 con un valor de 70,42%.

El tratamiento T1 obtuvo la media más baja del % de remoción sin tratamientos del 61,30 % mostrando que existió remoción sin tratamiento, los tratamientos T0 y T3 tuvieron una media de (67, 36% a- 70,42 %) y El tratamiento T2 obtuvo la media más alta de 83,70% presenciando una intervención directa de la Infiltración en la pérdida de contaminante.

Discusión

La media del porcentaje de remoción sin tratamiento del experimento corresponde a un valor de 70,44 % indicando que se perdió una cantidad alta de contaminante luego de la fumigación, esto se debió a que los días posterior a aplicación de Cypermetrina existió un alto nivel de precipitación de 13, 9 mm, permitiendo disolver con mayor facilidad la Cypermetrina existente en el suelo, esto concuerda con los estudios realizados por (Shimadzu, 2019, p. 2), que la solubilidad de las sustancias en el suelo está influenciada con la cantidad de disolvente, la solubilidad de la Cypermetrina en el agua es de 0,004 mg/L, por lo que al existir una elevada precipitación en el suelo aumenta su solubilidad.

Otro factor que genero un aumento en el % de remoción sin tratamiento fue el bajo porcentaje de materia orgánica presente en el suelo (2,5 %), Al existir escasas de la materia orgánica en el suelo disminuyó la fijación de la Cypermetrina al mismo, permitiendo así que la mayor parte de concentración de Cypermetrina se degrade con facilidad . (Wadhwa *et al.*, 2010, p. 583).

3.5.2 Porcentaje de la Remoción sin tratamiento de la Deltametrina

Tabla 3-10 Análisis de la Varianza Porcentaje de Remoción sin tratamiento de la Deltametrina

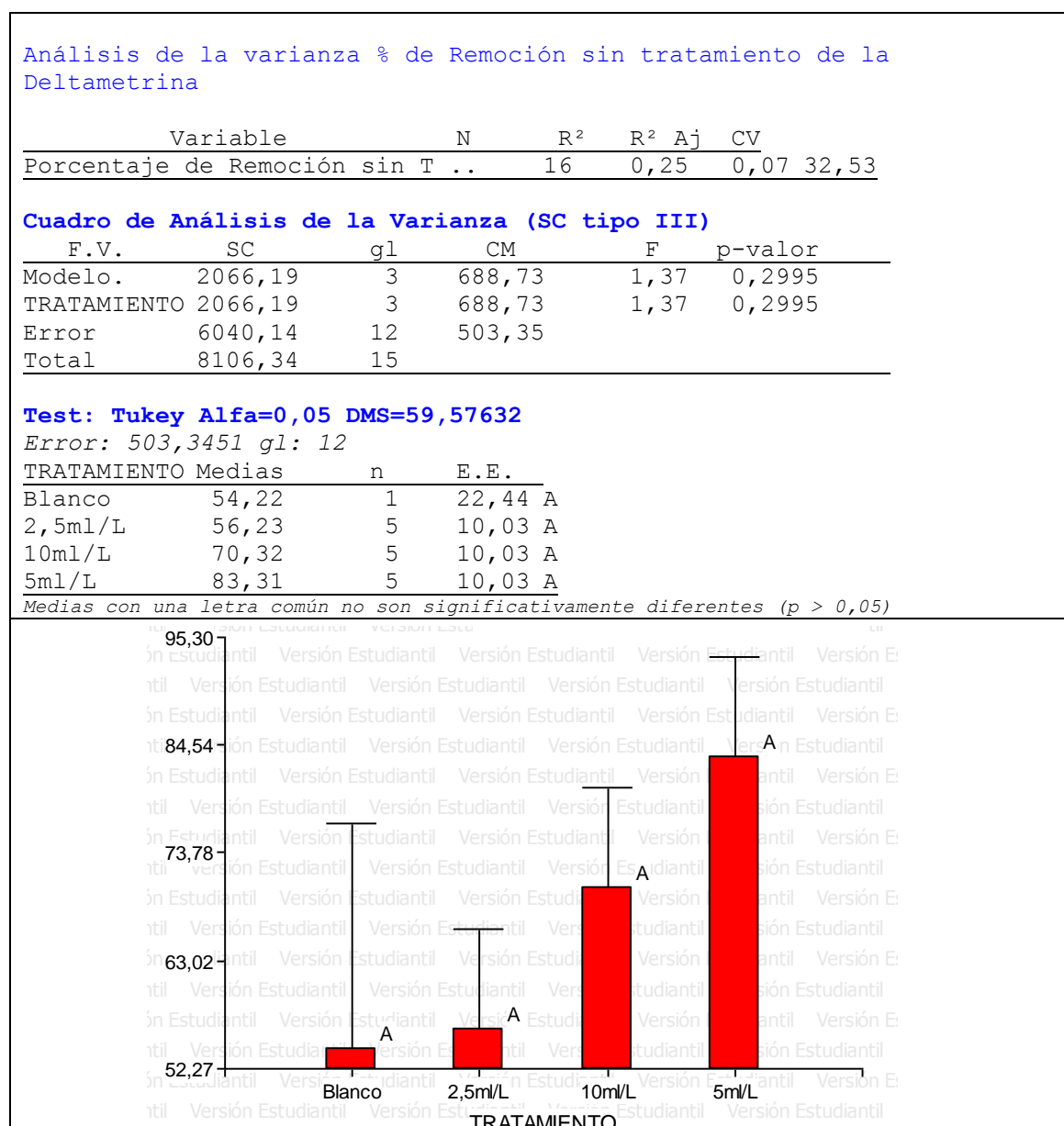


Tabla 3-11 Análisis de varianza del % de Remoción sin Tratamiento Tukey al 5%

Coeficiente de Variación	Significancia	Medias % y Rangos			
		T0 Suelo + Piretroide	T1 Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma	T2 Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma	T3 Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma
32,53	**	54,22 A	56,23 A	83,31 A	70,32 A

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Análisis

Según la Tabla 3-11, el coeficiente de variación para Deltametrina fue 32,53% y se determinó que los datos son confiables, porque se encuentra dentro de los valores permitidos para este tipo de ensayos. El ANOVA presenta una significancia estadística baja lo que indica que ningún tratamiento es diferente. La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo a Tukey al 5% establece que las medias de T0, T1, T2 y T3 son iguales al ubicarse en el rango A, Las medias del % remoción sin tratamiento genero los siguientes resultados: T0 con un valor de 54,22 %, T1 con un valor de 56,22 %, T2 con un valor de 83,31 % y T3 con un valor de 70,32%.

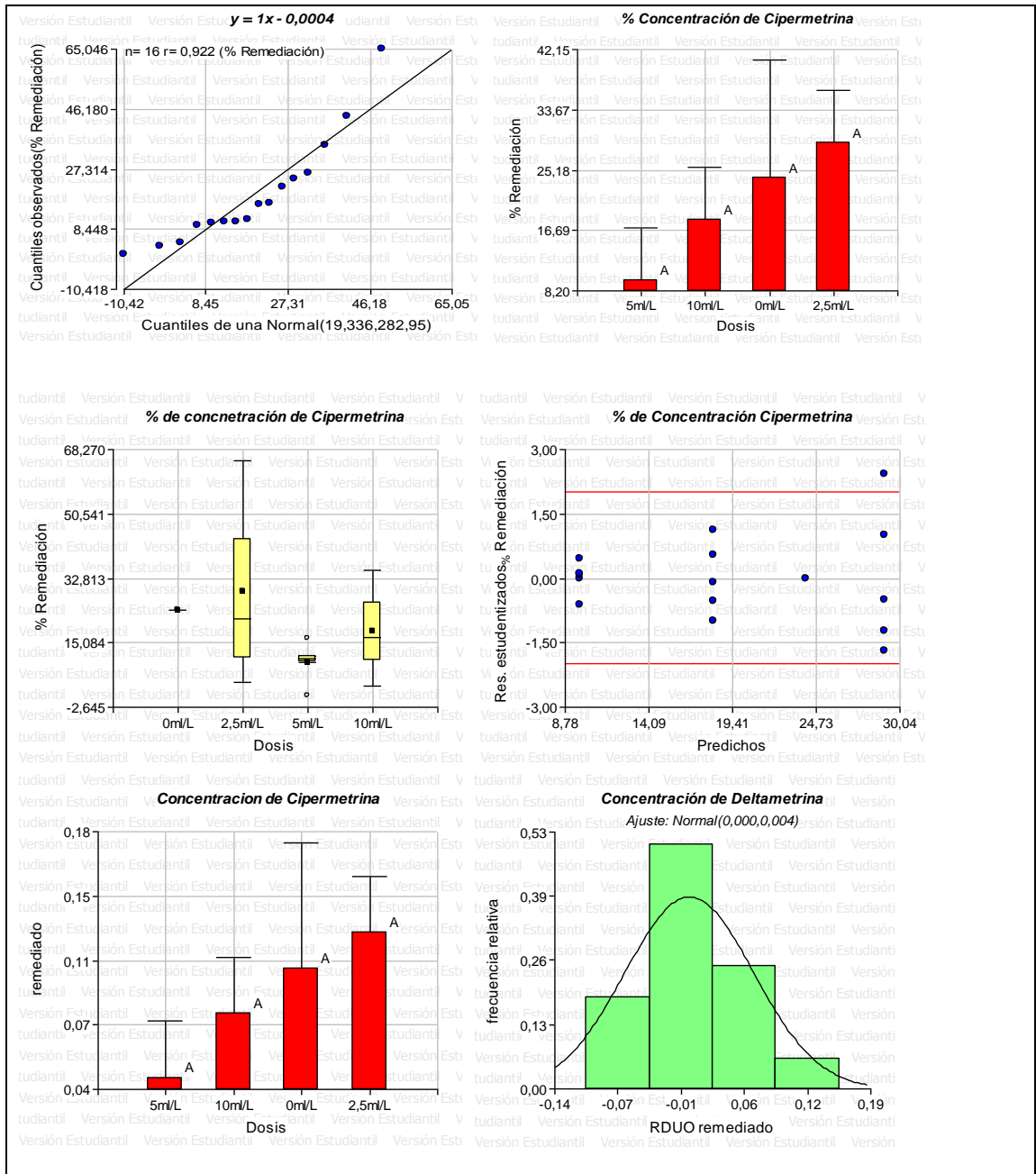
Discusión

El % de remoción sin tratamiento de la Deltametrina fue menor con respecto a la Cypermetrina. Ya que la Deltametrina se degrada en gases tóxicos como lo menciona (Machinery, 2018, pp. 1-15). Los tratamientos que obtuvieron las medias más baja en cuando al % de remoción sin tratamiento fueron: T0 con 54,22 % y la T1 con 56,23, mostrando que existió una mayor fijación del contaminante al suelo, El tratamientos T3 genero una media de 70,32 % y el tratamiento T2 obtuvo la media más alta de 83,33% por lo que existió menor fijación de Deltametrina al suelo. La media del % de remoción Sin tratamiento de la Deltametrina fue de 66,02 %, generando pérdida considerable luego de la fumigación. Durante los 2 primeros días de la aplicación del contaminante este se degrada con facilidad mediante la luz solar, otro factor por el cual existió una elevada remoción del contaminante fue la Precipitación de 13,9 mm, permitiendo disolver con mayor facilidad la Deltametrina ,según (Shimadzu, 2019, p. 2) la solubilidad puede diferir de acuerdo al volumen del disolvente, la solubilidad de la Deltametrina en el agua es de 0,003 mg/L, por lo que existió una elevada precipitación en el suelo durante el tratamiento del suelo. Los Piretroides se pueden disolver con facilidad en el Agua cuando existe una precipitación mayor a 13,9 mm.

3.5.3 Porcentaje de Remoción del *Trichoderma* al tratar *Cypermtrina* y *Deltametrina*

Tabla 3-12 Varianza de la Concentración removida y % Remoción de la *Cypermtrina*

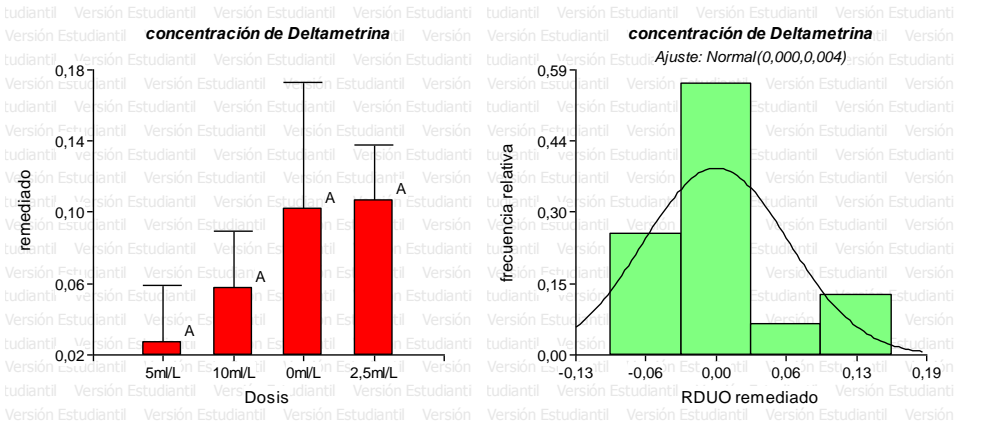
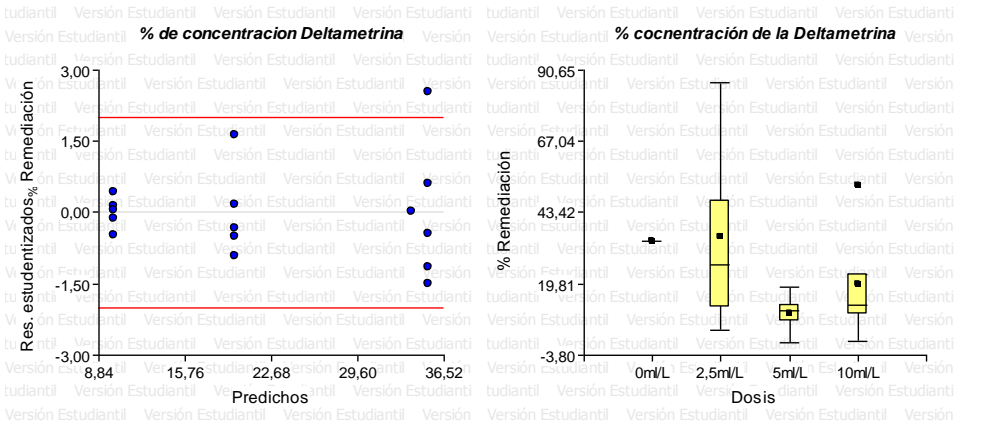
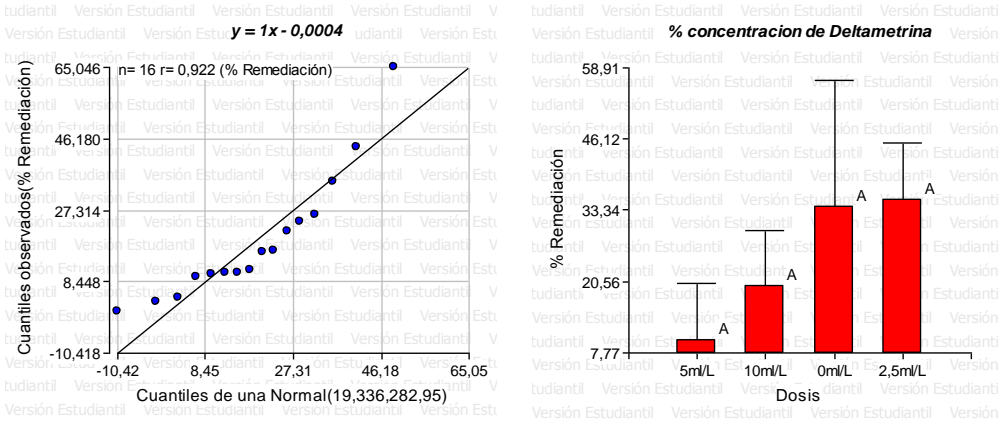
Análisis de la varianza de la Concentración removida de <i>Cypermtrina</i>												
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV								
remediado	16	0,22	0,03	85,86								
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)												
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor							
Modelo.	0,02	3	0,01	1,15	0,3677							
Dosis	0,02	3	0,01	1,15	0,3677							
Error	0,06	12	0,01									
Total	0,08	15										
Prueba T para muestras Independientes												
Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	
{0ml/L}{10ml/L}		1	5	0,10	0,08	0,03	-0,04	0,09	<0,0001	1,04	0,358	
{0ml/L}{2,5ml/L}		1	5	0,10	0,13	-0,02	-0,16	0,11	<0,0001	-0,43	0,6878	
{0ml/L}{5ml/L}		1	5	0,10	0,04	0,06	0,03	0,09	<0,0001	5,63	0,0049	
{10ml/L}{2,5ml/L}		5	5	0,08	0,13	-0,05	-0,17	0,08	0,2091	-0,85	0,4198	
{10ml/L}{5ml/L}		5	5	0,08	0,04	0,04	-0,02	0,10	0,1531	1,37	0,2065	
{2,5ml/L}{5ml/L}		5	5	0,13	0,04	0,08	-0,06	0,22	0,0138	1,66	0,1713	
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19002												
Error: 0,0051 gl: 12												
Dosis	Medias	n	E.E.									
5ml/L	0,04	5	0,03	A								
10ml/L	0,08	5	0,03	A								
0ml/L	0,10	1	0,07	A								
2,5ml/L	0,13	5	0,03	A								
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)												
Análisis de la varianza del % de Concentración removida de <i>Cypermtrina</i>												
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV								
% Remediación	16	0,23	0,03	85,52								
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)												
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor							
Modelo.	962,50	3	320,83	1,17	0,3607							
Dosis	962,50	3	320,83	1,17	0,3607							
Error	3281,69	12	273,47									
Total	4244,19	15										
Prueba T para muestras Independientes												
Grupo1	Grupo2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor	
{0ml/L}{10ml/L}		1	5	24,07	18,24	5,83	-9,80	21,47	<0,0001	1,04	0,3588	
{0ml/L}{2,5ml/L}		1	5	24,07	29,07	-5,00	-36,15	26,15	<0,0001	-0,45	0,6789	
{0ml/L}{5ml/L}		1	5	24,07	9,75	14,33	7,26	21,40	<0,0001	5,63	0,0049	
{10ml/L}{2,5ml/L}		5	5	18,24	29,07	-10,83	-39,78	18,12	0,2104	-0,86	0,4133	
{10ml/L}{5ml/L}		5	5	18,24	9,75	8,50	-5,76	22,75	0,1531	1,37	0,2065	
{2,5ml/L}{5ml/L}		5	5	29,07	9,75	19,33	-12,61	51,27	0,0139	1,68	0,1683	
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=43,91358												
Error: 273,4741 gl: 12												
Dosis	Medias	n	E.E.									
5ml/L	9,75	5	7,40	A								
10ml/L	18,24	5	7,40	A								
0ml/L	24,07	1	16,54	A								
2,5ml/L	29,07	5	7,40	A								
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)												



Fuente: InfoStat, 2019.

Tabla 3-13 Varianza de la Concentración removida y % Remoción de la Deltametrina

Análisis de la varianza de la Concentración removida de Deltametrina											
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV							
remediado	16	0,22	0,03	100,58							
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)											
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor						
Modelo.	0,02	3	0,01	1,14	0,3715						
Dosis	0,02	3	0,01	1,14	0,3715						
Error	0,06	12	4,8E-03								
Total	0,07	15									
Prueba T para muestras Independientes											
Grupo1	Grupo2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor
{0ml/L}{10ml/L}	1	5	0,10	0,06	0,04	-0,03	0,12	<0,0001	1,57	0,1919	
{0ml/L}{2,5ml/L}	1	5	0,10	0,11	-4,6E-03	-0,13	0,12	<0,0001	-0,10	0,9241	
{0ml/L}{5ml/L}	1	5	0,10	0,03	0,07	0,05	0,10	<0,0001	7,82	0,0014	
{10ml/L}{2,5ml/L}	5	5	0,06	0,11	-0,05	-0,17	0,07	0,3572	-0,90	0,3941	
{10ml/L}{5ml/L}	5	5	0,06	0,03	0,03	-0,04	0,10	0,0589	1,02	0,3369	
{2,5ml/L}{5ml/L}	5	5	0,11	0,03	0,08	-0,05	0,21	0,0096	1,67	0,1695	
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18472											
Error: 0,0048 gl: 12											
Dosis	Medias	n	E.E.								
5ml/L	0,03	5	0,03	A							
10ml/L	0,06	5	0,03	A							
0ml/L	0,10	1	0,07	A							
2,5ml/L	0,11	5	0,03	A							
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)											
Análisis de la varianza del % Remoción de Deltametrina											
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV							
% Remediación	16	0,22	0,03	100,51							
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)											
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor						
Modelo.	1753,46	3	584,49	1,15	0,3702						
Dosis	1753,46	3	584,49	1,15	0,3702						
Error	6120,12	12	510,01								
Total	7873,57	15									
Prueba T para muestras Independientes											
Grupo1	Grupo2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	Media(1)-Media(2)	LI(95)	LS(95)	pHomVar	T	p-valor
{0ml/L}{10ml/L}	1	5	34,00	19,74	14,26	-10,57	39,09	<0,0001	1,59	0,1861	
{0ml/L}{2,5ml/L}	1	5	34,00	35,26	-1,26	-42,15	39,63	<0,0001	-0,09	0,9359	
{0ml/L}{5ml/L}	1	5	34,00	10,10	23,90	15,51	32,30	<0,0001	7,90	0,0014	
{10ml/L}{2,5ml/L}	5	5	19,74	35,26	-15,52	-55,25	24,21	0,3573	-0,90	0,3940	
{10ml/L}{5ml/L}	5	5	19,74	10,10	9,64	-12,13	31,41	0,0589	1,02	0,3370	
{2,5ml/L}{5ml/L}	5	5	35,26	10,10	25,16	-16,58	66,90	0,0096	1,67	0,1695	
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=59,96943											
Error: 510,0097 gl: 12											
Dosis	Medias	n	E.E.								
5ml/L	10,10	5	10,10	A							
10ml/L	19,74	5	10,10	A							
0ml/L	34,00	1	22,58	A							
2,5ml/L	35,26	5	10,10	A							
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)											



Fuente: InfoStat, 2019

Análisis

Tabla 3-14 Análisis de varianza del % de Remoción de Cypermetrina por Tukey al 5%

Coeficiente de Variación	Significancia	Medias % y Rangos			
		T0 Suelo + Piretroide	T1 Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma	T2 Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma	T3 Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma
85,86	**	24,07A	29,07 A	9,75 A	18,24 A

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Como se observa en la Tabla 3-14 el coeficiente de variación es de 85,86% y se establece que los datos son confiables, puesto que se encuentra dentro de los valores permitidos para este tipo de ensayos experimentales. El ANOVA muestra baja significancia estadística lo que indica que todos los tratamientos son iguales. La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con Tukey al 5% establece los tratamientos T0, T1, T2 y T3 en el rango A, no existe diferencia entre tratamientos por lo que no existe el rango B.

La concentración partida del piretroide cypermetrina fue de 0,432 mg/kg (Tabla 3-6). Luego de los 2 días de la aplicación se obtuvo una concentración inicial de 0,1141 mg/kg generando un porcentaje de remoción sin tratamiento del 73,55 % de Cypermetrina. Luego de la inoculación de los hongos en los tratamientos, la media de degradación fue reducido A 29,07 % en el T1 (Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma), ubicándolo como el mejor tratamiento debido a la más alta media, seguido por el tratamiento testigo con un valor de 24,07 % , el tratamiento T3 (Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma) con un media de 18,24% y el tratamiento que presentó la menos media de degradación fue T2 (Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma), con un valor de 9,75 %.

Tabla 3-15 Análisis de varianza del % de Remoción Deltametrina por Tukey al 5%

Coeficiente de Variación	Significancia	Medias % y Rangos			
		TO Suelo + Piretroide	T1 Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma	T2 Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma	T3 Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma
100,51	**	34,0A	35,26A	10,10 A	19,74 A

Realizado por: SALINAS, Fabián, 2019

Tabla 3-15), se observa que el coeficiente de variación es de 100,51% y se establece que los datos son confiables, puesto que se encuentra dentro de los valores permitidos para este tipo de ensayos experimentales. El ANOVA muestra baja significancia estadística lo que indica que todos los tratamientos son iguales. La prueba de comparación múltiple de medias de acuerdo con Tukey al 5% establece los tratamientos T0, T1, T2 y T3 en el rango A, no existe diferencia entre tratamientos por lo que no existe el rango B.

La concentración partida del piretroide Deltametrina fue de 0,308 mg/kg (Tabla 3-7). Luego de los 2 días de la Aplicación se obtuvo una concentración inicial de 0,0095 mg/kg generando una remoción sin tratamiento del 68,99 % de Deltametrina. Luego de la inoculación de los hongos en los tratamientos, la media de degradación fue reducido A 35,26 % en el T1 (Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L Trichoderma), ubicándolo como el mejor tratamiento debido a la más alto media, seguido por el tratamiento testigo T0 (Suelo + Piretroide), genero un valor de 34,0 %, En el tratamiento T3 (Suelo + Piretroide+ 10ml/L Trichoderma) con un media de 19,74% y el tratamiento que presentó la menos media de degradación fue T2 (Suelo + Piretroide+ 5ml/L Trichoderma), con un valor de 10,10 %.

El tratamiento T1(Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L cepas de Trichoderma), la cantidad remoción de la Cypermetrina fue del 29,07 % y de la Deltametrina fue 35,x6 %, resultó como el mejor tratamiento, debido a que las cepas de los *Trichoderma* a una dosis de 2,5 ml/l con una concentración 1,0E+9 UFC/ml es ideal para la actividad enzimática de la difenil-dioxígeno oxidoreductasas (Conrado *et al.*, 2004; Mukherjee y Mittal, 2005, p. 1036; Flores *et al.*, 2009, p. 2) mencionan que la actividad enzimática difenil-dioxígeno oxidoreductasas es mayor cuando existe menor concentración de *Trichoderma*, debido que existe menos competencia por nutrientes. (De Luccas A, 2007) señala que los hongos más resistentes aumentaron su población cuando alcanzaron su actividad enzimática, presentando una acción más favorable durante los 15 días de aplicado el tratamiento.

Discusión

En el tratamiento que actuó como Blanco T0 (Suelo + Piretroide), la degradación se generó sin presencia fúngica, puesto que en el tratamiento T0 no se inocularon hongos, el rango de remoción de los insecticidas fue de 25 %, probablemente porque el suelo ya tenía una presencia de microorganismos nativos que ayudaron a la degradación del contaminante, por lo cual la actividad microbiana nativa tiene gran importancia en procesos de biorremediación in situ. Según, (Betancur, 2013) se debe tener en cuenta los factores fisicoquímicos de los contaminantes y cantidad de remoción por parte de los agentes biológicos.

El tratamiento T2 (Suelo + Piretroide+ 5 ml/L *Trichoderma*), con su rango de remoción de 6% a 10 % resultó como el peor tratamiento, una dosis de 5 ml/ L con una concentración de $1,0E+09$ UFC / ml es considerada como una dosis comercial, en esta concentración existe un aumento de la competencia de *Trichoderma spp* por nutrientes, (Espinosa, 2013) menciona que la competencia de las cepas de *Trichoderma spp* se genera por la escasez de hierro, fosfato de carbono y nitrato. Por lo que el hongo activa su mecanismo de defensa, bajando su población y su actividad enzimática, (De Luccas A, 2007). El tratamiento T3 (Suelo + Piretroide+ 10 ml/L *Trichoderma*), con su rango de remoción de 15% a 20 % resultó como un tratamiento medio a esta dosis existe una estabilidad, (Dobrosnki y Salazar, 2018) señala que el hongo puede generar mayor actividad enzimática después de un periodo de competencia, porque las cepas sobrevivientes generan mayor cantidad de enzimas.

Al final del tratamiento después de los 15 días de la aplicación del inóculo, la cantidad de residuo de Cypermetrina fue de 0,039 mg/kg y Deltametrina fue de 0,026 mg/Kg, demostrando que se encuentran por debajo de los límites permisibles (0,05 mg/kg). Al comparar el porcentaje de remoción el tratamiento T1 (35%), con el porcentaje de remoción blanco T0 (30%) se obtuvo una diferencia del 5%, En el estudio de (Torres, 2014) al comparar el porcentaje de remoción del tratamiento (Suelo + Piretroide+ *Trichoderma*), con el blanco se obtuvo una diferencia de remoción del 89 % .

3.5.4 Selección de la dosis de dosis

Análisis

Luego de realizar la estimación estadística mediante la comparación de Tukey al 5%, se determinó que estadísticamente no existe diferencia significativa, sin embargo numéricamente la dosis con mayor porcentaje de remoción fue el tratamiento T1 (Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L cepas de *Trichoderma*).

Si se realiza un análisis del aprovechamiento del producto por aplicación se obtiene que, con una dosis de 2,5ml se logra un rendimiento de 400 litros, mientras que con una dosis de 10ml el rendimiento llegaría hasta 100 l, lo que significa una merma del 75%.

Discusión

Con la dosis de 2,5 ml/L se puede remover mayor cantidad de Piretroides, por lo que existe mejor aprovechamiento del producto y menor residual del mismo en el suelo, esto concuerda con (Carbonell y Briozzo, 1975), en su estudio demostraron que las dosis bajas generan un menor efecto residual por genera un mejor aprovechamiento del mismo. En su estudio (Villacrés, 2014, p. 47) señala que la sobredosificación puede causar menor aprovechamiento de los plaguicidas. Los resultados que se obtuvieron demuestran que las dosis inferiores a dosis comercial, generan mayor porcentaje de remoción, generando un beneficio económico al utilizar el producto (TrichoFert).

CONCLUSIONES

- Se caracterizó las propiedades Físicas, Químicas y Biológicas del suelo, resultando los siguientes valores: PH de 7,60, Porcentaje de materia de 2,5 %, la textura Franco-Arenoso-limoso, 81 ppm de P, 5 ppm de Cu. 15 ppm de Mn, 4 ppm de Zn, 1,2 meq/100g de K, 7 meq/100g de Ca ,1,5 meq/100g de Mg, conductividad eléctrica de 0,3 mmhos/cm y Nitrógeno Total de 19 ppm ideales para producción agrícola, pero al existir escasas de materia orgánica y microelementos influenciaron el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en suelo, se encontraron microorganismos nativos (*Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, *Cladosporium spp.*) Que intervinieron probamente con la remoción de la Cypermetrina y Deltametrina.
- Las medias del porcentaje de remoción de la Cypermetrina por cada tratamiento fueron los siguientes: 29,07 % en el T1 (Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L *Trichoderma*), 24,07 % en el T0 (Suelo + Piretroide), 18,24% en el T3 (Suelo + Piretroide+ 10ml/L *Trichoderma*) y 9,75 % en el T2 (Suelo + Piretroide+ 5ml/L *Trichoderma*), en cuando a la Deltametrina se obtuvo los siguientes datos: 35,26 % en el T1 (Suelo + Piretroide+ 2,5ml/L *Trichoderma*), 34,0 % en el T0 (Suelo + Piretroide), 19,74% en el T3 (Suelo + Piretroide+ 10ml/L *Trichoderma*) y 10,10 % en el T2 (Suelo + Piretroide+ 5ml/L *Trichoderma*), la concentración de las esporas de la asociación de las cepas de *Trichoderma spp* fue de 1,05E+09 UFC/ml, Al comparar el porcentaje remoción de la Cypermetrina del tratamiento (T1) con el tratamiento Blanco (T0), se obtuvo un porcentaje de remoción del 5 %, en cuando Deltametrina se obtuvo un porcentaje de remoción del 1 %. Por lo tanto permitió demostrar la intervención de las cepas de *Trichoderma spp* en la remoción de la Cypermetrina y Deltametrina, debido a la actividad enzimática de la difenil-dioxígeno oxidoreductasas.
- La dosis de *Trichoderma* (Tricofer) seleccionada para la recomendación aplicación a suelos contaminados con piretroides es 2,5 ml/l, esto debido a que aunque estadísticamente no existió diferencia significativa numéricamente fue la que mejor porcentaje de remoción presento en la investigación.

RECOMENDACIONES

- Realizar el tratamiento de suelo contaminados con Piretroides con cepas *Trichoderma spp*, pero controlando la intervención de las variables: Precipitación, pH, Temperatura, Cantidad Materia Orgánica y nutriente, misma que influyen en el crecimiento de las cepas en suelo.
- Evaluar el comportamiento de las concentraciones de los *Trichoderma spp* (UFC/ml), para comprobar su significancia en el proceso de biodegradación de los contaminantes en el suelo.
- Comprobar el desempeño de remoción de las cepas *Trichoderma spp* al asociarse con otros Microorganismos nativos que generen la enzima difenil-dioxígeno oxidoreductasas como es el caso del *Pleurotus ostreatus*.
- Aumentar el número de tratamiento para verificar si las dosificaciones inferiores a la dosificación comercial tienen mejores resultados de remoción de los Piretroides.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO, S., ULACIO, D. y SANABRIA, M. Compatibilidad in vitro de extractos vegetales y *Trichoderma harzianum* y su efecto en el crecimiento de *Sclerotium rolfsii* sacc. y *Sclerotium cepivorum*. *BERK*, vol. 3. 2011. pp. 217-236.

ARIAS, C.A. *Evaluación de impacto ambiental y su incidencia en los efectos del componente agroproductivo del P.D.A. UNOCANT*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 2014. pp. 7-9

ASAMBLEA NACIONAL DEL ECUADOR y PRESIDENCIA DE LA REPÚBLICA. Código Orgánico del Ambiente. *Registro Oficial Suplemento Nro. 983*. 2017. pp. 92.

ATSDR. *Resumen de Salud Pública: Piretrinas y piretroides*. [en línea]. [Consulta: 7 abril 2019]. Disponible en: www.atsdr.cdc.gov/es

BAYER CROPSCIENCE. *Ficha de datos de seguridad de acuerdo al Reglamento (ce) no. sencor liquid sección 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad* [en línea]. 2015. [Consulta: 7 abril 2019]. Disponible en: https://www.cropscience.bayer.es/~media/BayerCropScience/Country-Spain-Internet/msds/HS_SencorLiquid.ashx.

BLOOMQUIST, J. *Insecticidas: Químicas y Características*. 2^{da} ed. Blacksburg-Virginia. 2013, pp. 50-60

BRAVENNAN, M. U.S. EPA, Pesticides, Label, *Trichoderma hamatum isolate*. 2008, Estados Unidos, (United State of America) p. 382

BUCHELI, M. *Evaluación del impacto ambiental causado por el cultivo intensivo de fresa (Fragaria vesca) en la parroquia Huachi Grande, Cantón Ambato*. [En línea] (tesis). (Maestría) Universidad de Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 2015. pp. 20-23. [Consulta: 2019-03-14]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/10940>

CANO, M., Revista U.D.C.A. *Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, Trichoderma spp. y Pseudomonas spp.* [en línea], 2011, (México) 14 (2), pp. 151-31. [Consulta: 15 abril 2019]. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/771>

CARBONELL, J. y BRIOZZO, J. Aplicación de Plaguicidas en el cultivo. *Aplicación de Plaguicidas en papas*, n° 35 (1975), (Ecuador) pp. 1 - 2

CÁRDENAS, J. *Caracterización microbiológica y producción de trichoderma harzianum y*

Trichoderma viride en cultivo artesanal. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2010. p. 5. [Consulta: 2019-04-15]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.com>

COELLO, J. *Aplicación del hongo Pleurotes ostreatus como alternativa para biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. (Tesis). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 2011. pp. 15-40.

CONRADO, V., et.al. *Producción de lacasas y generación de nuevas isoformas en cultivo sólido de Pleurotus ostreatus y Agaricus bisporus infectados con Trichoderma spp.* (Tesis). (Pregrado) Universidad Autónoma del Estado de Morelo, Morelos, México. 2004. pp. 60

CURILLO, S., *Análisis de residuos de plaguicidas químicos en alimentos de consumo humano con la metodología de laboratorio ELISA trabajo de investigación*. (Tesis). (Pregrado) Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. 2015. p. 90

DE LUCCAS A. Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista iberoamericana de micología*. 2007. p. 24

DOBROSNKI, J. y SALAZAR, M.J., *Efecto del Trichoderma harzianum. en el agua de riego y la microbiología del suelo*. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Universidad Técnica Ambato, Ambato, Ecuador. 2018. p. 7 [Consulta: 2019-04-19]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec>

DONOSO, E., LOBOS, G.A. y ROJAS, N. Efecto de Trichoderma harzianum y compost sobre el crecimiento de plántulas. *Bosque (Valdivia)*, vol. 29, no. 1 .2008. pp. 52-57.

ESPINOSA, R. Evaluación de tres cepas de Trichoderma para el control de Fusarium Oxysporum en el cultivo de maracuyá (Passiflora Edulis Var Flavicarpa). Quito-Ecuador, 2013, p. 60

FERNÁNDEZ, M., *Estudio del comportamiento fotoquímico y determinación de compuestos fitosanitarios en matrices medioambientales agroalimentarias*. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Universidad de Santiago de Compostela, Santiago, Chile. 2010. p. 458 [Consulta: 2019-0-39]. Disponible en: <https://minerva.usc.ec>

FLORES, C., et.al, Producción de Biomasa de Trichoderma Harzianum Bajo Diferentes Esquemas. Centro de Ciencias Aplicadas de Universidad Nacional Autónoma de México [en línea], 2009, (México), pp. 1-2. [Consulta: 03 abril 2019]. Disponible en: <https://smbb.mx3>

GAD HUACHI GRANDE. *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia*

Rural Huachi Grande. [en línea]. Pdyot Huachi Grande. 2015. [Consulta: 8 Agosto 2018]. Disponible en: <http://www.parroquiahuachigrande.gob.ec>

GALLO, G. *Agroquímicos prohibidos o restringidos* [en línea]. Informe de SAGP. 2006. [Consulta: 5 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.agroindustria.gob.a>

GLIESSMAN, R. *Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible..* 3ª ed. Turrialba-Costa Rica, 2002, p. 358

GUERRERO, S. y MOLINA, J. *Drosophila suzukii en fresa: Revisión de técnicas aplicadas para el control y manejo de la plaga - Buscar con Google. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.* 2015. pp. 1-15.

HARRIS, D., *Análisis Químico Cuantitativo. Análisis Químico Cuantitativo. del D. Harris.* Barcelona: s.n.,2003. pp. 723-724.

HERNÁNDEZ, G. et.al, *Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria,* vol. 18, no. 1, 2016. pp. 139. ISSN 2500-5308. DOI 10.21930/rcta.vol18_num1_art:564.

ILLESCAS, G. *Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia San Joaquín.* (Tesis). (Pregrado) Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Cuenca, Ecuador. 2017. p. 17.

INECC MEXICO. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático Gobierno [en línea]. 2010. [Consulta: 29 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.gob.mx/inecc/#1730>.

INFANTE, D. *Mecanismos De Acción De Trichoderma frente A Hongos Fitopatógenos. Hongos filamentosos* [en línea]. 2009. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/Scielo>.

INIAP. Centro Internacional de la Papa. Abya-Yala.. Quito-Ecuador, 2002. p. 300

INSUASTY, C. et.al, *Sanidad vegetal y protección de cultivos. Corporación Ciencia. Tecnología. Agropecuaria.* [en línea], 2004, (Colombia), pp. 237-249. [Consulta: 04 mayo 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n2/v15n2a10.pdf>

LEHOTAY, S. y AERSON, K., *Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues. Chromatography A, 2010,* vol. 1217, pp. 3548-2560.

LIU, P., LIU, Q. y LIU, J. *Environ. Sci. China,* 2010, p. 1123.

MACHINERY, C. *Basta de pesticida. Razones abandonar a los pesticidas ,nº1* (2018),(Belgica). pp. 1-5

MANCHENO, M. y KROEGER, A. No más problemas de salud : manual técnico para el control de malaria, dengue, chagas, Leishmaniosis y oncoceriosis. 1ª ed. México D.F -México: Editorial Pax, 2001 p. 264.

MARTINEZ, C., Riesgos en el uso de la Cipermetrina. [en línea]. 2003. [Consulta: 2 agosto 2018]. Disponible en: http://www.rachel.org/files/document/Riesgos_en_el_Uso_de_la_Cipermetrina.htm.

MASUH, H. Síntesis estereoselectiva, actividad insecticida de piretroides, 1998. pp. 163.

MORENO, A. Guía de Salud y seguridad. México D.F. 22ª ed. México D.F-México, 1993 p. 38.

MORENO, E. y ALMADA, M., Revista internacional de contaminación ambiental ITS Sonora Mexico. *Análisis de Piretroides en suelo y En Agua de zonabana Agrícola Y Ur*, vol. 28, n°. 4 (2012), pp. 303-310.

MUKHERJEE, I. y MITTAL, A., Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bull. Environment. Contamination*. 2005. pp. 1034-1040.

OLALDE, V. y AGUILERA, L. Revista Tierra de la Universidad Autónoma de Chapingo. *Microorganismos y Biodiversidad*, 1998. pp. 289-292

ORTIZ, M., YÁÑEZ, L. y DÍAZ F. Informe Técnico Apoyado por la Comisión de Cooperación Ambiental de América. *Identificación de Indicadores para el Monitoreo de la Deltametrina y del DDT y sus Metabolitos en Muestras Humanas y Ambientales, 2004, (San Luis Potosi) p.42*

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. y WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organización Panamericana de la Salud. *La salud en las Américas*. 2002, pp. 1-6

PAUCAR, B., DÍAZ, N. y ALVARADO, S. Efecto del manejo de suelo sobre las poblaciones microbianas. *Revista Científica Iniap*. [En línea], 2011, Ecuador, pp. 1-7. [Consulta: 21 abril 2019]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec>

PAZMIÑO, O. Estudios sobre residuos. *Ecuador es calidad*, vol. 2, 2015. pp. 45-52.

POALACIN, J. Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* en sustrato sólido. [En línea] (Tesis). (Pregrado) Universidad Central de

Ecuador, Quito, Ecuador. 2015. p. 107. [Consulta:2019-04-08]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4776/1/T-UCE-0017-128.pdf>

RAJU, M.N. *La cuantificación de las células bacterianas o esporas de hongos mediante el uso de cámara de Neubauer* [en línea]. Puyo, 2008. [Consulta: 20 mayo 2019]. Disponible en: http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4816/10/Anexo_10.pdf

RAMÍREZ, J.A. y LACASAÑA, M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, vol. 4, nº 2 (2001), (United State of America) pp. 67-75.

ROSERO, G *Evaluación de cuatro cepas de Trichoderma sp. y sus combinaciones para el control de Fusarium oxysporum en sandía (Citrullus lannatus)* (tesis). (Pregrado) Universidad de Guatemala, Guatemala, Guatemala. 2008. pp. 20-50.

SALAZAR, M. *El Trichoderma harzianum el agua de regadío y la microbiología del suelo.* [en línea] (tesis).(Pregrado) Universidad Técnica Ambato, Cevallos, Ecuador, 2017. p. 74. [Consulta: 2019-04-02]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec>

SANTOS, M.A.T. Dos, AREAS, M.A. y REYES, F.G.R. Piretróides numa visão geral. *Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition*, vol. 18, no. 3, 2007. pp. 339-349. ISSN 0103-4235.

SCHLEIER, J. y PETERSON, R., Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. *Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides*, 2010, (United State of America) pp. 100-130.

SCOTT, R.C. y RAMSEY, J.D., Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule. *The Journal of investigative dermatology*, vol. 89, no. 2, 1987. pp. 142-146.

SHIMADZU, A. Quantitative Analysis of Pyrethroids in Soil and Sediment. [en línea], 2019, (United State of America) 5(1), pp. 1-5. [Consulta: 27 marzo 2019]. ISSN 1090-7807. Disponible en: www.shimadzu.com.ec

SIMKOVIC, M., et.al. Cadependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma virid*, 2008. pp. 291-298.

STAMETS, P. *How mushrooms can help save the world. Trichoderma spp.*, 2005, (United State of America. p. 329

THOMAS, S. Higher Macrofungi to Clean Up the Environment. *Battelle Environmental Issues*, 2000, (United State of America) pp. 6-47

TORO, F. Caracterización de cuatro cepas de *Trichoderma* y estudio de su resistencia a diferentes plaguicidas comerciales.[En línea] (tesis).(Pregrado) Universidad de Técnica Ambato, Ambato, Ecuador. 2012 p. 266. [Consulta: 2019-03-22]. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec>

TORRES, E. Evaluación de la Biodegradación de un insecticida Piretroide en muestras de suelo de cultivo de papa mediante la adición de *Trichoderma harzianum* Y *Pleurotus ostreatus*. [En línea] (tesis). (Pregrado) Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. 2014. pp. 109-223 [Consulta: 2018-08-02]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec>

US EPA. *Control de plagas y uso seguro de pesticidas para consumidores* [En línea]. Atlanta, 2017 [Consulta: 03 abril 2019]. Disponible en: <https://espanol.epa.gov>

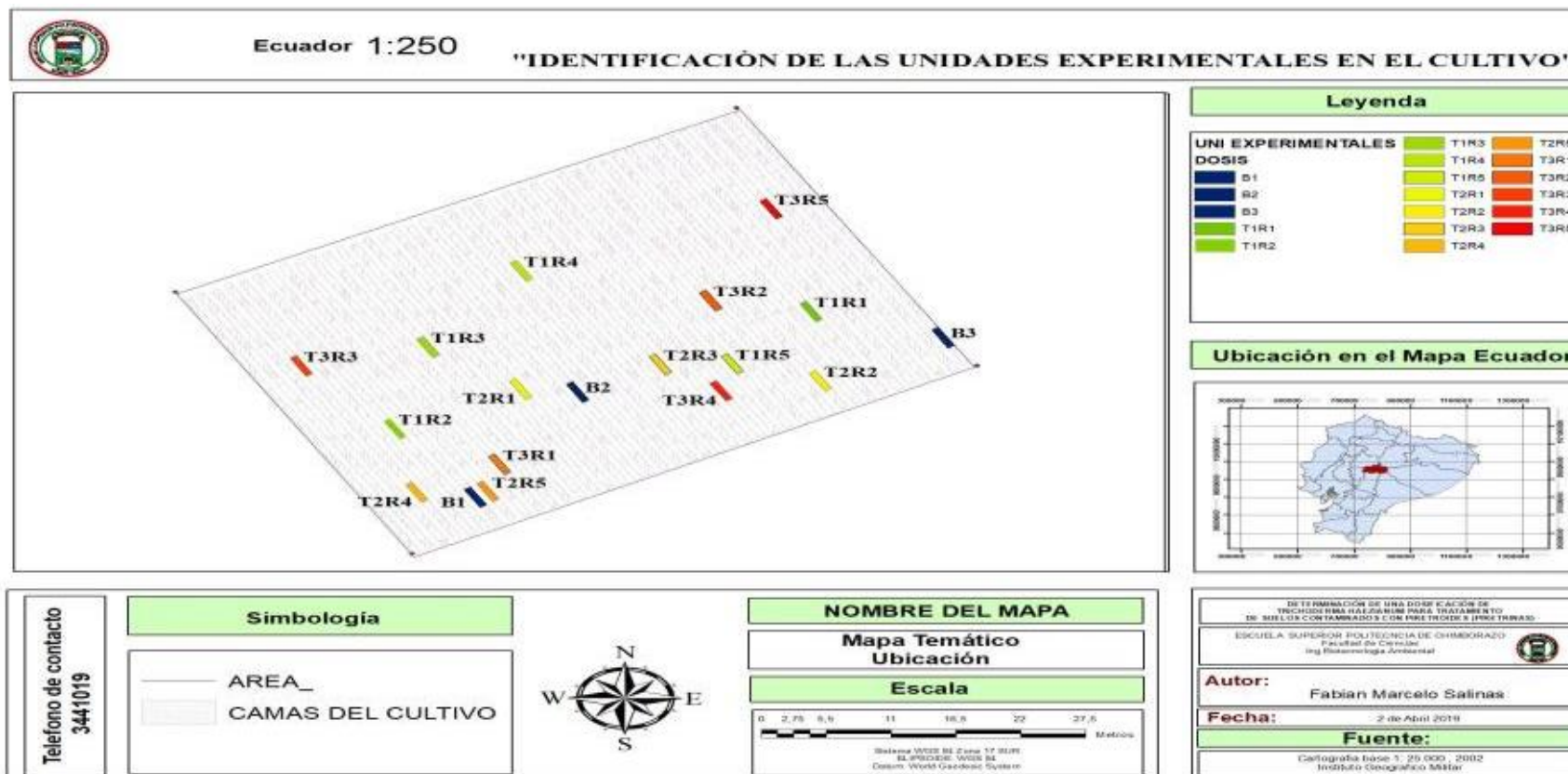
VELÁSQUEZ, O., et al. Cuenta en placa de bacterias. *Revista Biotecnología*. 2009, (Ecuador) pp. 1-10.

VILLACRÉS, N. Uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). [En línea] (tesis). (Pregrado) Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador. 2014. p. 162. [Consulta: 2015-05-21]. Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec>

WADHWA, B., et al. Analysis of pesticide residues in soils. *Handbook of pesticide*, 2010, (Mexico) p. 583.

ANEXOS

Anexo A Mapa de identificación



Anexo B Reporte de parámetros para la caracterización del suelo estudio



UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
LABORATORIO DE SUELOS



Casilla 18-01-334 Telfs. 746151-746171 Fax 746231 Cevallos - Tungurahua

REPORTE # 10

Datos del cliente:

NOMBRE:	Fabian Marcelo Salinas	COD. LAB	10 2019
ATENCIÓN:	Fabian Marcelo Salinas	MUESTRA:	Suelo
DIRECCIÓN:	Huachi Grande	MATRIZ :	S
PROVINCIA:	Tungurahua	ANÁLISIS:	Completo
CANTÓN:	Ambato		

Datos de la muestra:

	FECHA DE TOMA DE MUESTRA: 25/02/2019
RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	INGRESO AL LAB. : 25/02/2019
LOTE:	SALIDA: : 08/03/2019
CULTIVO ANTERIOR:	
CULTIVO ACTUAL:	FRESA

ANÁLISIS	Unidad	Valor	Nivel
pH extracto suelo agua		7,48	P N
C.E extracto suelo agua 1:2,5	mmhos/ cm	0,3	N S
Textura	Clase		
Arena	%		
Limo	%		
Arcilla	%		
M.O.	%	2,5	B
N - TOTAL	ppm	19	B
P	ppm	81	A
K	meq/100 g	1,2	A
Ca	meq/100 g	7	A
Mg	meq/100 g	1,5	A
Cu	ppm	5	A
Mn	ppm	15	M
Zn	ppm	4	M
Ca/Mg	meq/100 g	5	O
Mg/K	meq/100 g	1	B
Ca+Mg/K	meq/100 g	7	B

INTERPRETACION	
M Ac	Muy Acido
Ac	Acido
Me Ac	Medianamente Acido
L Ac	Ligeramente Acido
P N	Practicamente Neutro
L AL	Ligeramente Alcalino
Me AL	Medianamente Alcalino
AL	Alcalino
N	Neutro
B	Bajo
M	Medio
A	Alto
T	Toxico
N S	No Salino
L S	Ligeramente Salino
S	Salino
M S	Muy Salino
O	Optimo

Parametro analizado	Metodo	
pH	Electroquímico	PHConductimetro Orion 550A
C.E	Electroquímico	PHConductimetro Orion 550A
Textura	Hidráulico	Liquidora Bouyoucos
M.O	Gravimétrico	Balanza Analítica
N Total	Kjeldahl	KjELDAHL
Textura	Orson Mod	Espectrofotometro Genesis 20
K,Ca,Mg	Orson Mod	Espectrofotometro de A.A Perkin Elmer 100
Fe,Cu,Mn,Zn	Orson Mod	Espectrofotometro de A.A Perkin Elmer 100

Marcia Buenaño
Quim. Marcia Buenaño
RESPONSABLE DEL ANALISIS



Plantsphere Laboratories

TAXONOMIA DE TRICHODERMA spp

DATOS DE IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Fecha de emisión Lab: 31.12.2013	Orden de trabajo No.: PSL-090199
Remitente: MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA	Responsable: Ing. Cristina Troya
Tipo de muestra: Aislados de <i>Trichoderma</i> nativos	Tipo de Análisis: taxonómico
Marca Comercial: ninguna	Código del Cliente: MAGAP

TUNGURAHUA	Especie / Genero	Principales rasgos Taxonómicos
T-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Colonias amarillo verdosas. Conidióforos de estructura piramidal. Hifas de 3,7-7, μm diam., conidios de 2,5-3,7 x 2,3-2,5 μm . Clamidosporas intercalares de 12,2-15,5 μm .
T-2	<i>Trichoderma hamatum</i>	Reverso de color amarillo, pústulas llanas, filoides 4,3-8,5 x 3,7-5,7 μm , conidióforos de más de 144 μm . Conidio 3,5-5,7 x 2,7-3,9 μm .
T-3	<i>Trichoderma koningi</i>	Colonias de rápido crecimiento, conidióforos variables, filoides botella de 3 a 5 filoides de 7,2-12,2 x 2,2-3,5 μm . Conidios 3,5-4,7 x 2,5-3,7 μm .
T-4	<i>Trichoderma</i> sp.	Reverso sin color, filoides verticilados, 3,8-7,5 x 2,0-3,3 μm . conidios verde pálidos 2,5-4,5 x 1,5-2,9

Dr. Ing. MSc. Carlos Falconi Borja Ph.D.
PLANTSPHERE LABORATORIES (PSL)
0999796977 - 6023531
www.agriculture-technology.de
plantspherelab@biosoftware.de
psl@biosoftware.de

Anexo D Identificación, Preparación Medio Cultivo y Siembra Caja Petri

 	  
<p>Georreferenciación del Cultivo</p>	<p>Delimitaciones las Unidades Experimentales</p>
	
<p>Preparación Agar PDA</p>	<p>Dispensado del Agar en las Cajas</p>
	
<p>Vidal de Cepa</p>	<p>Siembra en Caja Petri</p>

Anexo E Incubación, Identificación Microbiana, Preparación de Sustrato

	
<p>Incubación cepa Trichoderma</p>	<p>Verificación crecimiento Micelial</p>
	
<p>Pesado y lavado del sustrato (Arroz)</p>	<p>Precocción y Enfundado del Sustrato</p>
	
<p>Siembre de la Cepa en Funda</p>	<p>Crecimiento de la Cepa en Funda</p>

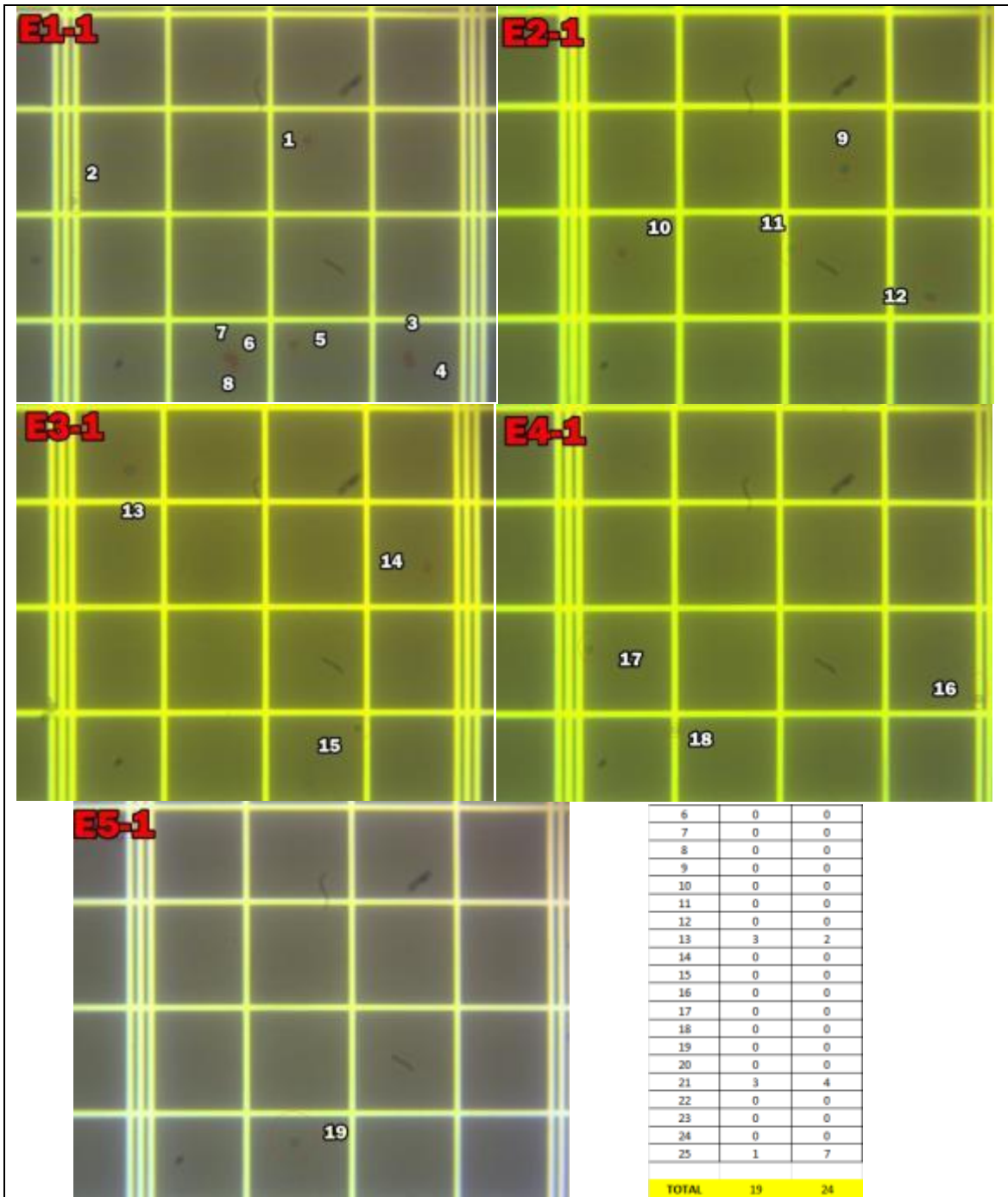
Anexo F Replicación, Cosecha, Dilución seriada y Contaje

	
<p>Incubación de la Cepa</p>	<p>Proceso de extracción de esporas</p>
	
<p>Preparación soluciones seriadas</p>	<p>Peración solución Madre</p>
	
<p>Preparación de Placa</p>	<p>Identificación de la Placa</p>

Anexo G Fumigación y Toma de Muestras

	
<p>Solución de Cypermetrina y Deltametrina</p>	<p>Bomba e inyector Manual</p>
	
<p>Solución de Trichoderma</p>	<p>Inyección en el cultivo</p>
	
<p>Muestra de Suelo</p>	<p>Toma y Pesaje de Muestra Suelo</p>

Anexo H Contaje Esporas Cámara 1



Anexo I Contaje Esporas Cámara 2



CALCULOS					
# esporas	21,5	ufc	# esporas	4,3	ufc
superficie	2	mm ²	FACTOR	250000	Promedio de la suma de 5 cuadros hemisferio norte y 5 cuadros hemisferio sur
profundidad	0,1	mm	dilución madre	100	Promedio 10 cuadros
dilución	0,1	l/xxxxx	factor de dilución	10	
dilución madre	100				
Concentracion	1075000	ufc/ul	Concentracion		
FINAL	1,075E+09	ufc/ml	FINAL	1,075E+09	ufc/ml
FINAL	1,08E+09	ufc/ml	FINAL	1,08E+09	ufc/ml

FORMA DE CUENTA

CLIENTE: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
PROYECTO: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
FECHA DE EMISIÓN DE LA CUENTA: **2024/08/01**
FECHA DE VENCIMIENTO: **2024/08/31**
VALOR TOTAL: **1.000,00**
VALOR DE LA CUENTA: **1.000,00**
VALOR DE PAGOS: **0,00**
VALOR DE LA CUENTA POR PAGAR: **1.000,00**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD	VALOR UNITARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS	1.000,00	US\$	1.000,00
Total	1.000,00	US\$	1.000,00

[Firma]
LABOLAB

Este documento es una copia de la cuenta emitida por el laboratorio de análisis químicos. No es válido para fines legales. Para más información, consulte con el departamento de facturación.

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS

FORMA DE CUENTA

CLIENTE: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
PROYECTO: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
FECHA DE EMISIÓN DE LA CUENTA: **2024/08/01**
FECHA DE VENCIMIENTO: **2024/08/31**
VALOR TOTAL: **1.000,00**
VALOR DE LA CUENTA: **1.000,00**
VALOR DE PAGOS: **0,00**
VALOR DE LA CUENTA POR PAGAR: **1.000,00**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD	VALOR UNITARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS	1.000,00	US\$	1.000,00
Total	1.000,00	US\$	1.000,00

[Firma]
LABOLAB

Este documento es una copia de la cuenta emitida por el laboratorio de análisis químicos. No es válido para fines legales. Para más información, consulte con el departamento de facturación.

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS

FORMA DE CUENTA

CLIENTE: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
PROYECTO: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
FECHA DE EMISIÓN DE LA CUENTA: **2024/08/01**
FECHA DE VENCIMIENTO: **2024/08/31**
VALOR TOTAL: **1.000,00**
VALOR DE LA CUENTA: **1.000,00**
VALOR DE PAGOS: **0,00**
VALOR DE LA CUENTA POR PAGAR: **1.000,00**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD	VALOR UNITARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS	1.000,00	US\$	1.000,00
Total	1.000,00	US\$	1.000,00

[Firma]
LABOLAB

Este documento es una copia de la cuenta emitida por el laboratorio de análisis químicos. No es válido para fines legales. Para más información, consulte con el departamento de facturación.

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS

FORMA DE CUENTA

CLIENTE: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
PROYECTO: **LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS**
FECHA DE EMISIÓN DE LA CUENTA: **2024/08/01**
FECHA DE VENCIMIENTO: **2024/08/31**
VALOR TOTAL: **1.000,00**
VALOR DE LA CUENTA: **1.000,00**
VALOR DE PAGOS: **0,00**
VALOR DE LA CUENTA POR PAGAR: **1.000,00**

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	UNIDAD	VALOR UNITARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS	1.000,00	US\$	1.000,00
Total	1.000,00	US\$	1.000,00

[Firma]
LABOLAB

Este documento es una copia de la cuenta emitida por el laboratorio de análisis químicos. No es válido para fines legales. Para más información, consulte con el departamento de facturación.

LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICOS

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10001
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10002
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10003
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10004
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10005
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

NUMERO DEL CERTIFICADO: 2022-10006
FECHA DE EMISIÓN: 10 de Julio de 2022
CLIENTE: S.A. DE ASESORIA EN GESTIÓN EMPRESARIAL
DIRECCIÓN: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
TELÉFONO: +57 311 4567890
EMAIL: info@laeolab.com
LABORATORIO: Calle 100 No. 100-100, Bogotá, D.C.
FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: 07 de Julio de 2022
FECHA DE EMISIÓN DEL CERTIFICADO: 10 de Julio de 2022

PARAMETRO	METODO	UNIDAD	RESULTADO
Temperatura	20°C	°C	20.5
pH	7.0		7.2

Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.

LABORATORIO LAEOLAB

NOTA: Este certificado es válido para el uso interno del cliente. No debe ser utilizado para fines legales o regulatorios. La responsabilidad de los datos aquí presentados es del cliente.