

FACULTAD DE INGENIERÍA

Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental

Tesis

Influencia del glifosato en el hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de *Rhizoctonia solani* del cultivo de algodón a nivel de laboratorio en Huancayo 2019

Elsa Xiomara Medrano De la Torre

Para optar el Título Profesional de
Ingeniera Ambiental

Huancayo, 2019

Repositorio Institucional Continental
Tesis digital



Esta obra está bajo una Licencia "Creative Commons Atribución 4.0 Internacional" .

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, por estar conmigo y apoyarme siempre; a mi abuelita, por ser mi guía y modelo a seguir; a mi asesora la Mg. Blga. Verónica Nelly Canales Guerra, por orientarme y guiarme en el transcurso de la tesis. Por último, también agradezco a la Universidad Continental por permitirme cumplir mi sueño de culminar estudios.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación es dedicado a mi familia, que apostaron por mis sueños y creyeron en mí, en todo momento; a los ingenieros que me apoyaron durante el transcurso de mi carrera y ayudaron a llevar a cabo esta investigación; dedico mi investigación a mi enamorado y amigos que estuvieron conmigo durante el transcurso de mi vida universitaria; y me han respaldado y motivado para seguir adelante en mis metas.

ÍNDICE

PORTADA	
AGRADECIMIENTO	2
DEDICATORIA	3
ÍNDICE	4
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO I.....	12
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	12
1.1 Planteamiento y formulación del problema.....	12
1.1.1 Planteamiento del problema	12
1.1.2 Formulación del problema.....	13
1.1.2.1 Problema general.....	13
1.1.2.2 Problema específico	14
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivo general	14
1.2.2 Objetivo específico.....	14
1.3 Hipótesis y descripción de las variables	15
1.3.1 Hipótesis de investigación	15
1.3.2 Hipótesis de nula.....	15
1.3.3 Hipótesis específica	15
CAPÍTULO II	16
2.1 Antecedentes de la investigación	16
2.1.1 Antecedentes internacionales.....	16
2.1.2 Antecedentes nacionales.....	18
2.2 Bases teóricas	20
2.2.1 Microorganismos del suelo.....	20
2.2.1.1 Hongos.....	21
2.2.1.1.1 Hongos del género Trichoderma	21
2.2.2 Herbicida.....	23
2.2.2.1 Etimología	23
2.2.2.2 Clasificación de los herbicidas	23
2.2.2.3 Glifosato	24
2.2.2.3.1 Glifosato en el sistema suelo – planta.....	24
2.2.3 Cultivo de microorganismos	25
2.2.3.1 Fuentes de energía metabólica y necesidades para el crecimiento	26
2.2.3.2 Factores de crecimiento.....	26

2.2.3.2.1	Factores ambientales	26
2.2.3.3	Métodos de cultivo.....	26
2.2.3.3.1	Medios de cultivo	27
2.2.3.3.1.1	Tipos de medios de cultivo	27
2.2.3.3.1.2	Desarrollo celular de una especie en particular	27
2.2.3.3.1.3	Estudio microbiológico de material natural	28
2.2.3.3.1.4	Aislamiento de un microorganismo en particular	28
2.2.3.3.1.4.1	Aislamiento de microorganismos en cultivos puros	28
2.2.3.3.2	Agares.....	29
2.2.3.3.2.1	Agar Papa Dextrosa (APD).....	29
2.2.3.3.2.2	Agar Sabouraud Glucosado.....	29
2.2.3.3.3	Métodos de conteo	30
2.2.3.3.3.1	Método tradicional	30
2.2.3.3.3.2	Métodos específicos.....	30
2.2.3.3.3.2.1	Recuento de colonias de microorganismos variables	30
2.2.3.3.3.2.2	Recuento de colonias de microorganismo totales	30
2.3	Definición de términos	31
2.4	Modelo teórico conceptual.....	32
CAPÍTULO II		33
METODOLOGÍA		33
3.1	Método y alcance de la investigación	33
3.1.1	Método de investigación.....	33
3.1.1.1	Método general o teórico de la investigación	33
3.1.1.2	Método específico de la investigación.....	33
3.1.2	Alcance de la investigación	33
3.1.2.1	Tipo de investigación.....	33
3.1.2.2	Nivel de investigación	33
3.2	Diseño de la investigación	33
3.2.1	Tipo de diseño de investigación	34
3.3	Población y muestra	34
3.3.1	Población.....	34
3.3.2	Muestra	34
3.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	34
3.4.1	Técnicas de recolección de datos	34
3.4.2	Instrumentos de recolección de datos	35
3.5	Procedimiento de la investigación	36
CAPÍTULO IV		40

RESULTADOS Y DISCUSIONES	40
4.1 Resultados del tratamiento y análisis de la información	40
4.2 Comprobación de la hipótesis.....	41
4.2.1 Comprobación de hipótesis general	42
4.2.2 Comprobación de hipótesis específicas	43
4.3 Discusión de los resultados.....	44
CONCLUSIONES.....	47
RECOMENDACIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1 Prueba de normalidad	41
Tabla 2 H de Kruskal-Wallis (dosis de glifosato - conteo de conidias de la T.harzianum).....	42
Tabla 3 Prueba de Ducan	44
Tabla 4 Promedio de conidias contadas en Cámara de Neubauer	66
Tabla 5 Resultados del conteo del N° de conidias/ml $\times 10^{-2}$	67
Tabla 6 Resultado del conteo del N° de conidias totales	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Resultados generales	40
Gráfico 2 Reproducción y reducción de número de conidias	41

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Microorganismos	20
Figura 2 Trichoderma Harzianum	22
Figura 3 Interacción planta - suelo del glifosato.....	25
Figura 4 Fuentes de energía metabólica	26
Figura 5 Modelo teórico conceptual	32
Figura 6 Cámara de Neubauer.....	35
Figura 7 Modelo de procedimiento realizado	37
Figura 8 Relación Glifosato – Microorganismos del suelo.....	39
Figura 9 Diagrama de cajas y bigotes.....	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Matriz de consistencia	56
Anexo 2 Operacionalización de las variables	57
Anexo 3 Respuesta de la responsable con respecto a la procedencia del hongo T.h.....	57
Anexo 4 Compra de la cepa - SENASA	58
Anexo 5 Ficha 1 Muestra control por dosis	59
Anexo 6 Ficha 2 Control por dosis	59
Anexo 7 Datos.....	60
Anexo 8 Procesamiento de los datos	63
Anexo 9 Tabla resumen del conteo de conidias en la Cámara de Neubauer	66
Anexo 10 Tabla del conteo de conidias / ml.....	67
Anexo 11 Tabla del conteo de conidias totales.....	67
Anexo 12 Evidencia fotográfica.....	68
Anexo 13 Constancia de uso de laboratorio de la Universidad Continental	71

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es determinar, la influencia del glifosato en el conteo de conidias del hongo *Trichoderma harzianum*, cultivado en condiciones de laboratorio. Este hongo se encuentra en todo tipo de suelo, sobre todo en aquellos de uso agrícola donde cumplen una función benéfica. El glifosato, es un herbicida muy utilizado en la eliminación de malas hierbas y arbustos, su efecto puede extenderse a los hongos benéficos, solo si su permanencia en el suelo supera las especificaciones de la ficha técnica. Por esta razón, se realiza el cultivo de *T. harzianum* sometido a una exposición directa con diferentes concentraciones de glifosato; la dosis media (1 ml) en la investigación surge a partir de la recomendada por el fabricante del producto y se establecen cuatro más, dos dosis mayores (1.25 ml y 1.50 ml) y dos menores (0.50 ml y 0.75 ml). Los datos se recolectaron usando fichas de observación. Se observó que todas las dosis disminuyen el número de conidias, incluyendo la dosis media de 1 ml que produce una reducción del 54 % en comparación a la muestra control. Las dosis de 1.25 ml y 1.50 ml llegan a reducir hasta un 65 % y 81 % respectivamente. Por lo tanto, este herbicida influye negativamente en el crecimiento del hongo y consecuentemente inhibe las acciones benéficas del mismo.

Palabras clave: *Trichoderma harzianum*, dosificación, glifosato, ensayo.

ABSTRACT

The objective of the present investigation is to determine the influence of glyphosate on the conidia count of the *Trichoderma harzianum* mushroom grown under laboratory conditions. This fungus is found in all types of soil, especially in those for agricultural use where they perform a beneficial function. Glyphosate is an herbicide widely used in the elimination of weeds and shrubs, its effect can be extended to beneficial fungi and its permanence in the soil exceeds the specifications of the data sheet. For this reason, culture of *T. harzianum* subjected to direct exposure with different concentrations of glyphosate is performed, the average dose (1 ml) in the investigation arises from that recommended by the manufacturer of the product and four more are established, two major doses (1.25 ml and 1.50 ml) and two minor doses (0.50 ml and 0.75 ml). Data was collected using observation cards. All doses were observed to decrease the number of conidia including the mean 1 ml dose producing a 54% reduction compared to the control sample. The doses of 1.25 ml and 1.50 ml reduce up to 65% and 81% respectively. Therefore, this herbicide negatively influences the growth of the fungus and consequently inhibits its beneficial actions.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, dosage, glyphosate, test.

INTRODUCCIÓN

Una de las actividades humanas que surge en las primeras etapas de evolución del hombre es la agricultura, dicha actividad es imprescindible para el abastecimiento de alimentos y marca claramente la transición entre una vida nómada a sedentaria. Durante años esta actividad se ha desarrollado y evolucionado, pero con el transcurrir del tiempo se presentaron dificultades como la pérdida de los nutrientes del suelo, las plagas, crecimiento de maleza, degradación, contaminación, erosión, heladas, entre otros. Los seres humanos han tomado medidas, para prevenir o generar las condiciones necesarias para superar estas adversidades. El crecimiento de maleza es una de las complicaciones más frecuentes, para lo cual se implementan métodos físicos como la labranza, para quitar la maleza de una forma sencilla y manual, esto es sencillo en pequeñas hectáreas de terreno, pero cuando son más extensas requiere de más horas de trabajo y mano de obra al final terminan incrementando costos. Debido a ello, durante los años 50, surgen los primeros productos químicos que facilitan el trabajo y la eliminación de maleza (1).

Por los años 70 en medio del auge del uso de herbicidas se descubre la efectividad de un nuevo compuesto llamado “glifosato” o N-(fosfonometil) glicina que interfiere con la síntesis del triptófano, los aminoácidos fenilalanina y tirosina, que genera la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) que utilizan las plantas para su crecimiento. Este compuesto fue usado con fines diferentes a los cultivos, con el pasar del tiempo se introdujo en el control de rastrojos de cultivos, iniciándose así una expansión de su uso a todo tipo de cultivo hasta que llegara a convertirse en un herbicida muy utilizado por diversas marcas a nivel global (2). A partir de entonces, el uso masivo y desmesurado de este compuesto conllevó a que durante los años 80 se replanteará la aplicación en las cosechas por considerarlo una de las posibles causas de un alto índice de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas cercanas a los cultivos. Sin embargo, al no tenerse pruebas contundentes se continuó con el uso del compuesto. Debido a la eficacia del herbicida las personas decidieron incrementar la dosis para poder obtener los mismos resultados en menor tiempo posible, esto generó mayores riesgos a la salud de las personas y/o el ambiente, siendo este último el medio con el cual tiene su primer contacto.

En la actualidad el glifosato es relacionado con el cáncer debido a algunos “estudios realizados por científicos independientes y determinaron a este compuesto como muy nocivo para la salud humana” (3). En EEUU un jardinero llevó a juicio a la empresa que produce este herbicida alegando que el uso continuo por 4 años le ha producido un tipo de cáncer llamado “linfoma no Hodgkin”, un cáncer que ataca a los linfocitos; y ganó el juicio, convirtiéndose en el primer caso donde una empresa es llevada a la corte y pierde(4). Al conocerse esta demanda varios países pretenden prohibir el uso del herbicida, como Brasil que tomo esta medida, sin embargo no duró mucho tiempo porque decidieron dar marcha atrás en su decisión al poco tiempo y aún se desconoce los motivos. (5) En el Perú se ha iniciado una investigación por parte de la Dirección

General de Salud Ambiental (DIGESA), hasta el momento no se pronuncia, ni se ha implementado alguna medida para evaluar y proteger los suelos de este herbicida.

Hoy en día se requiere de diversos productos químicos, que ayuden en el cultivo de alimentos, debido a que el suelo no dispone de los nutrientes ni las condiciones necesarias para hacerlo por cuenta propia, sin embargo, están generando problemas ambientales y de salud por la acumulación y el contacto que se tiene con estos. Los componentes biológicos cumplen una función muy importante para evitarlo, los microorganismos tienen una importancia en la sustentabilidad de la vida del suelo, entre estos se encuentra al hongo del género *Trichoderma* y realiza actividades simbióticas a favor de las plantas(6). Sin embargo, debido a la gran cantidad de compuestos químicos en contacto puede haber una alteración en el equilibrio entre este hongo y otros microorganismos con los que coexiste. Por esta razón, se evaluará la influencia del glifosato sobre un microorganismo benéfico del suelo, el hongo *Trichoderma harzianum*.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

1.1 Planteamiento y formulación del problema.

1.1.1 Planteamiento del problema.

El glifosato es un herbicida muy utilizado comercialmente, fue elaborado con el objetivo de eliminar hierbas y arbustos que han crecido en un tiempo y espacio no deseado por el ser humano y para la agricultura (7). Este herbicida es absorbido por las hojas y no por la raíz, se han presentado casos en los cuales por factores de tiempo y acumulación han generado derivados (mezclándose con otros componentes) o debido a altas concentraciones presentan secuelas perjudiciales para el entorno y la salud humana (8). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) este herbicida es considerado como un posible compuesto cancerígeno para el ser humano. El primer contacto de este herbicida es con el ambiente, es en este dónde actúa, se acumula y luego lamentablemente generan reservorios en el suelo (9).

El suelo se interconecta con otros componentes del ambiente, a partir de la infiltración a aguas subterráneas y ríos próximos que terminan en el mar; puede acumular sustancias que se convierten en vapores debido a un cambio de fase y son liberados a la atmósfera. Mientras tanto, los diferentes organismos vivos (excluyendo por ahora al ser humano) están en contacto con estas sustancias de forma directa o indirecta y sienten las primeras repercusiones de este herbicida. Los microorganismos del suelo son los que tienen mayor contacto con estos compuestos y evidencian los efectos, generándose las primeras afectaciones al equilibrio y balance del suelo (10). Uno de estos microorganismos del suelo es el hongo del género *Trichoderma*, puede ser encontrado en casi todo tipo de suelo con sus diferentes especies, esto se debe a su amplio rango de temperatura y condiciones fisicoquímicas para subsistir, además de presentar un crecimiento rápido. Una de las principales especies es *Trichoderma harzianum*, se encuentra de forma natural en un número importante de suelos agrícolas debido a que requieren materia orgánica y desechos vegetales de los cultivos para poder crecer y realizar sus funciones, una de sus características que tiene es aumentar y mejorar el desarrollo de la planta inhibiendo el crecimiento de patógenos, además de generar condiciones que estimulan la absorción de nutrientes para el crecimiento de la planta, por lo que se destaca entre las más usadas para el control biológico de patógenos fúngicos del suelo como es *Rhizoctonia solani* (11). Para cumplir con esta acción biocontroladora tiene mecanismos de acción directos e indirectos, en caso del primer tipo de mecanismo se destaca la antibiosis, generación de compuestos inhibidores del patógeno, secreción de enzimas, micoparasitismo, competencia por

nutrientes y espacio con el patógeno; entre los mecanismos indirectos se tiene la detoxificación de la planta de las toxinas, la estimulación a la planta para generar la capacidad de resiliencia a la infección de patógenos, solubilidad de nutrientes que en condiciones normales la planta no puede acceder y crea un ambiente favorable para el desarrollo radical que ayudará a la planta a incrementar su tolerancia al estrés (11). La *T. harzianum* produce tres tipos de propágulos, es decir tiene tres formas de reproducción y son: hifas, clamidosporas y esporas “conidias”, siendo esta última la más usada e importante. Al encontrarse en suelos de cultivo donde se aplica el glifosato, el hongo puede ser afectado en su comportamiento, crecimiento o funciones, así se encuentre de forma natural o introducido como control biológico.

El interés por investigar estos efectos o influencia de estos compuestos sobre los microorganismos del suelo es reciente, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) fomenta el interés por saber qué clase de compuestos son usados en tierras de cultivos y que repercusión trae su uso en la salud y el ambiente, y recomienda evitar el uso de algunos como el glifosato. En el Perú no hay muchos estudios o investigaciones que evalúen los efectos del glifosato sobre el suelo, en especial, sobre su microflora y microfauna, esto se debe, que por años se ha dado poca importancia al excesivo uso de herbicidas y pesticidas sobre las tierras de cultivo y las consecuencias que acarrea (12). En el Valle del Mantaro es adquirido en dos presentaciones, frascos de un 1L o granulado de 450 mg/L, y tienen diferentes nombres, pero se especifica que el componente activo principal es el glifosato; la dosis usada en campo es L/200L y es muy recomendado por su eficacia, pero se desconoce los efectos que puede tener en el medio ambiente.

Tomando en cuenta todo lo antes mencionado se debe establecer la influencia de este herbicida en los microorganismos que cumplen una función benéfica en el suelo, el hongo *Trichoderma harzianum* es la mejor opción. Para poder llegar a establecer dicha influencia solo con este microorganismo se debe partir desde lo más visible, como por ejemplo su crecimiento o reproducción y para ello lo mejor sería realizar en condiciones de laboratorio para así controlar mejor las variables.

1.1.2 Formulación del problema

1.1.2.1 Problema general

¿Cuál es la influencia del glifosato en la reproducción de *Trichoderma harzianum* a nivel de laboratorio?

1.1.2.2 Problema específico

¿Cuál de las concentraciones de glifosato influye en el número de conidias de *Trichoderma harzianum*?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Determinar qué tipo de influencia tiene el glifosato en la reproducción de *Trichoderma harzianum* a nivel de laboratorio.

1.2.2 Objetivo específico

Describir cuál de las concentraciones de glifosato influye en el número de conidias de *Trichoderma harzianum*.

Justificación

La investigación pretende identificar y abordar la problemática del uso del herbicida glifosato y sus efectos en el suelo, en particular sobre *Trichoderma harzianum* en condiciones de laboratorio. En el aspecto social su uso como herbicida es recurrente entre los agricultores por su bajo costo, sin embargo, el uso desmesurado acarrea problemas de salud y ambientales (12). Si las personas toman conciencia de la toxicidad que tiene este herbicida o cualquiera que contenga como componente activo al glifosato, debería considerar restringir su uso; en el mejor de los casos sustituir por herbicidas ecológicos, que tengan menor grado de perdurabilidad, no dejen residuos en alimentos o en el suelo, sobre todo que no sean tóxicos y perjudiquen el estado del suelo (13).

En índice de salud, se han incrementado casos de enfermedades relacionadas a problemas sanguíneos en personas que tienen o tuvieron una exposición prolongada con el herbicida; por lo general, en agricultores y/o jardineros y en sus familias, siendo considerado el glifosato como el posible causante de estas alteraciones (14).

Por último, en índice ambiental, su uso desmedido, desde muchos años atrás, viene acarreando serios problemas, que quizás antes no se tomaron en cuenta por estar focalizados, pero hoy en día se ha expandido en el entorno, suelo, agua y aire, llevando consigo la toxicidad a animales y seres humanos en contacto (15). Se debe tomar medidas para mitigar las consecuencias negativas al medio ambiente y los daños causados por el uso de este herbicida.

1.3 Hipótesis y descripción de las variables

1.3.1 Hipótesis de investigación

El glifosato influye en la reproducción de *Trichoderma harzianum* debido a que disminuye sus propágulos mediante conidias.

1.3.2 Hipótesis de nula

El glifosato no influye en la reproducción de *Trichoderma harzianum* debido a que no disminuye sus propágulos mediante conidias.

1.3.3 Hipótesis específica

Las concentraciones de 1.25 ml y 1.50 ml de glifosato disminuyen significativamente el número de conidias de *Thichoderma harzianum*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación.

2.1.1 Antecedentes internacionales.

En investigación realizada (16) se relaciona la muerte de las abejas con el contacto que tuvieron con el herbicida glifosato, para esto se tuvo que usar dos colmenas con el objetivo de tener la mayor cantidad de datos posibles. Una vez realizado el experimento se obtuvo como resultado que el glifosato no estaba relacionado directamente con la muerte de las abejas, pero si tenía una fuerte repercusión negativa en su flora intestinal especialmente en un microorganismo muy importante para esta. Dicho microorganismo es una bacteria que se encarga de procesar los alimentos y permitir su desarrollo adecuado y al haber una disminución de esta, llega a afectar a las abejas de una manera indirecta y muy discreta que probablemente a largo plazo podría significar la muerte de estas.

En investigación hecha (17), evalúa los efectos del glifosato en hongos micorrízicos arbusculares, los cuales son expuestos de forma directa e indirecta a este compuesto para evaluar así la viabilidad de las esporas y la capacidad que tienen de colonizar las raíces de los pastizales después de haber tenido contacto con el herbicida. Al realizar los ensayos se comprueba que el glifosato afecta de forma negativa en este tipo de hongo y que esto se evidenciaba en ambos tipos de exposición que tuvieron.

En investigación realizada (18), se determina el efecto que tiene el herbicida glifosato sobre dos puntos, el primero la fertilidad microbiológica y química del suelo y el segundo determinar si hay residuos en las semillas de frijol que se encuentran biofortificados en el departamento de Cesar, Colombia. Para lograr esto se estableció como metodología correlacional y un ensayo donde se contaba con muestras que tenían aplicación del compuesto y las que no, además también se le agregó a algunas coberturas sintéticas (mulch) o a otras no. Teniendo como conclusión que si se usa el herbicida se debe añadir mulch, esto para evitar que el glifosato tenga repercusión o efecto negativo en el sistema radical de la planta y sobre la microbiota del suelo.

En investigación elaborada (19), evaluó las interacciones microbiológicas en la rizosferas de la soja GR1 Y GR, y el rendimiento del cultivo en diferentes concentraciones del glifosato que fue aplicado en las etapas de crecimiento del cultivo, dichas etapas de crecimiento fueron V2, V4 Y V6. Se tuvo como resultados que el compuesto impacta negativamente en las interacciones complejas que tienen los

microorganismos y también sobre características bioquímicas, lo que significaría efectos perjudiciales posteriores en la productividad de este tipo de cultivo.

En investigación desarrollada (20), realiza un análisis de todos los aspectos teóricos y prácticos que engloban el hongo *Trichoderma* y evalúa también el rol que tiene este en los ecosistemas agroforestales. Teniendo como resultado que de todas las especies que tiene este hongo son solo tres las que son más comercializadas como agentes de control biológico y estos son: *T. viride*, *T. harzianum* y *T. polysporum*, debiéndose esto a la gran efectividad que presentan para la mejora de las condiciones del suelo.

En investigación desarrollada (21), se evaluó si el herbicida glifosato llegaba a afectar negativamente a la orquídea terrestre de nombre científico *Epidendrum melinanthum* y si esto también se presentaba en sus hongos endófitos de su raíz. Se estableció tres dosis para la investigación, que fueron tomada de la dosis usada en campo aplicada para la maduración de la caña de azúcar y se obtuvo como resultados que el herbicida generó un cambio de decoloración en el tallo y la hoja de la orquídea, y en cuanto a sus hongos genero una afectación en uno de ellos en los otros fueron afectaciones mínimas, poco a considerar.

En investigación hecha (22), se estudia el efecto estimulante de la *Trichoderma Harzianum* en tres tipos de plantaciones de árboles. Para ello se realiza tres ensayos, uno por especie a nivel de vivero, teniendo un diseño aleatorio en cuatro parcelas de tratamiento. Para evaluar el efecto de este hongo en las plantaciones se toma en cuenta la germinación, diámetro y altura del tallo, biomasa seca en raíz, entre otros. Se tiene como resultado que la *T.harzianum* no incrementa la geminación de estas especies, pero si se veía una influencia favorable en el incremento del diámetro, altura y generación de biomasa seca en las raíces de las plantaciones.

En investigación realizada (23), se determina la capacidad inhibidora de tres aislamientos de *Trichoderma harzianum* nativas en la Zabila Aloe Vera que tiene una infección fitosanitaria de *Sclerotium rolfsii Sacc*, para lo cual se tiene un diseño aleatorio y realiza cuatro tratamientos con cinco réplicas por cada una. En el resultado que obtuvo demuestra que los tres aislamientos de *T.harzianum* nativas poseen un alto potencial (de 50 – 90%) para ser controles biológicos de la *Sclerotium rolfsii Sacc*.

En investigación desarrollada (24), se busca determinar las mejores condiciones de crecimiento de los hongos *T. hamatum* y *T. harzianum* utilizando arrocillo como sustrato sólido para su cultivo. Se usa cuatro porcentajes diferentes de humedad por cada hongo, así como también tres diferentes temperaturas que son 21°C, 25°C y 28°C, todo esto, para determinar a qué porcentaje y temperatura crece mejor estos hongos con el

sustrato de arrocillo. Concluyendo que en la temperatura de 25°C y a un porcentaje de 41,3% de humedad se llega a tener una producción adecuada de estos hongos en un menor tiempo.

En investigación realizada (25), se evalúa cinco diferentes concentraciones de *T. harzianum* sobre la calidad y rendimiento del fruto de tomate, se tiene un diseño experimental en bloques y se realiza seis tratamiento con seis replicas respectivamente. Para los tratamientos se tiene las siguientes dosificaciones: 0.04, 0.2, 1, 2 y 5 kg/ha y las variables evaluadas son: rendimiento total, calidad, altura, peso y rentabilidad económica. El resultado que se tuvo fue que las dosis de 1, 2 y 5 kg/ha han actúan favorablemente para cada una de las variables, pero entre estas tres fue la dosis 1 kg/ha la más rentable.

En investigación hecha (26), se tiene como objetivo resumir los aspectos teóricos y prácticos relevantes para la determinación de las diferentes especies de *Trichoderma spp*, debido a que la identificación taxonómica de esta es complicada si se desea aplicar solo aspectos morfológicos, por lo cual se plantea usar como opción más factible realizar una identificación molecular para reconocer de forma específica de que especie de *T.spp* se trata y así evitar confusiones la taxonomía similar que presentan a simple vista.

En investigación desarrollada (27), se realiza primero una caracterización microbiológica de los hongos *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*, para así poder evaluar el crecimiento en medios de cultivo artesanal con relaciones C:N (carbono: nitrógeno) a través de una fermentación en fase sólida y líquida, todo esto para determinar la mejor concentración que llegue a producir una gran cantidad de biomasa. El resultado que se obtuvo en la investigación indica que se obtiene mejores resultados en un medio artesanal 20:10 en fase sólida.

En investigación realizada (28), se estima el efecto de dos cepas de *Trichoderma harzianum*, TCN-014 (nativa) y TCC-005 (comercial), sobre el crecimiento y germinación de maracuyá. Para ello se evalúa por un periodo de 15 días el tiempo que tarda en germinar, el porcentaje y el índice de velocidad de germinación. Después de realizar el ensayo se concluye que se tiene mejores resultados con la cepa nativa que con la cepa comercial, pero que en términos generales la *T. harzianum* presenta características muy benéficas para el cultivo de maracuyá ya sea en su forma nativa o comercial.

2.1.2 Antecedentes nacionales.

En investigación hecha (29), se evalúa el efecto que tiene el glifosato sobre un suelo de características forestales, esto con el fin de ver los efectos que pueda tener este componente sobre los microorganismos existentes en este tipo de suelo. El resultado que se tuvo al evaluar los parámetros físicos y químicos del suelo indican que no hubo una

variación considerable, pero que esto podría cambiar al evaluar dichos parámetros por un tiempo prolongado; en caso del parámetro biológico si había una gran variación, ya que si hay una repercusión negativa sobre todo en las lombrices de tierra y que esto se debería a que este parámetro es más sensible al compuesto.

En investigación realizada (30), se buscó determinar si el glifosato afectaba directamente en la microfauna de un suelo de cultivo de café, para ellos se estableció tres dosis a aplicar que son de un 1L, 1.5L y 2L en parcelas establecidas al azar con 12 plantas por cada parcela. Se llegó a concluir que este compuesto no presenta un efecto directo en la cantidad de microorganismos pero que si afectaba de forma indirecta en sus principales funciones que llegan a ser muy importantes para la salud y calidad del suelo.

En investigación desarrollada (31), para llegar a optimizar otros sustratos que beneficien la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*, se utiliza diferentes mezclas de residuos agrícolas tales como: cascarilla de arroz entero, cascara de maní, cascarilla de arroz molida con Ñelen (arroz triturado de descarte) y fuentes que sean nutritivas como urea, carbonato de calcio y agua. Para llevar a cabo esto y encontrar el mejor sustrato, se preparará 14 tratamientos y tres repeticiones por cada uno. Se tiene como resultado que los diferentes tratamientos llegan a presentar un 100% de pureza en el cultivo de conidias de *Trichoderma Harzianum*, por lo que se comprueba la efectividad como sustratos de estos.

En investigación desarrollada (32), se analiza el efecto de tres especies de hongos de género *Trichoderma* (*Trichoderma Atroviride*, *Trichoderma Harzianum* y *Trichoderma Viride*) sobre huevos de *Meloidogyne sp.*; para lo cual se realiza seis tratamientos donde tres cumplen con el rol de control. Se realiza un cultivo por cada hongo y cuatro réplicas de este por cada tratamiento, comprobándose que las tres especies de *trichoderma* tienen un efecto negativo en el desarrollo de los huevos de *Meloidogyne sp* todo en condiciones controladas de laboratorio.

En investigación realizada (33), se muestrea un suelo, para determinar los microorganismos existentes en este, luego se procede a hacer aislamiento y clasificación de la *Trichoderma spp*, una vez identificado el hongo se cultiva y realiza tres ensayos con el herbicida glifosato utilizando dos dosis (4800ppm y 1440ppm). Al realizar el análisis de resultado se determina que las dos dosis de glifosato usadas en la investigación presentan efectos negativos en el hongo.

En investigación realizada (34), se establece tres bioensayos para su investigación, uno por cada compuesto planteado y una por la mezcla de estos, se realiza esto con el fin de evaluar los riesgos ambientales existente por compuesto y por la mezcla

de ambos. La Evaluación de Riesgo Ambiental (ERA) va dirigido directamente la calidad de suelo ya que el gusano (*Eisenia fétida*) suele ser un bioindicador de la calidad ambiental del suelo y es el organismo que se usa para evaluar el efecto de los compuestos sobre este.

En investigación desarrollada (35), se evalúa el efecto que tiene las cepas de *Trichoderma spp* en el control de *Mildui* y su repercusión en la mejora del rendimiento de los cultivos de quinua. El *Mildui* en una plaga que afecta de manera constante a los cultivos de quinua, por ello en esta investigación se trabaja con 10 cepas *de T. spp* que son aplicadas en cultivos con esta plaga, teniendo buenos resultados con las diferentes cepas, siendo que algunas inhiben el crecimiento de *mildui* y otras mejoran el rendimiento de la quinua.

En investigación hecha (36), se determina la efectividad del herbicida glifosato en la eliminación de la polilla de la papa en condiciones de laboratorio, se realiza un bioensayo creando diferentes extractos con distintas concentraciones que luego son aplicadas a los huevecillos, larvas en primer estadio y en adultos, para así determinar en qué estado se presentan las mejores condiciones y la concentración requerida.

2.2 Bases teóricas.

2.2.1 Microorganismos del suelo.

Los microorganismos son importantes ya que estos son responsables de la vida; dinámica de transformación y desarrollo que se lleva a cabo en el suelo (37).

Entre los microorganismos que hay en el suelo existen dos grandes grupos que son la microflora y la microfauna. La microflora está compuesta por bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios; y tienen funciones muy importantes dentro del suelo para mantener su fertilidad, por ellos deben mantener una población adecuada, esto con el fin de que liberen los nutrientes necesarios para que haya un buen desarrollo vegetal.

Figura 1 Microorganismos



Fuente: (37)

2.2.1.1 Hongos.

El uso de Hongos en la agricultura es muy frecuente porque existe infinidad de estos, los cuales son beneficiosos para el suelo y en especial para las raíces de las plantas, permitiéndoles aprovechar del suelo los macronutrientes más importantes que están presentes en este como son el potasio y el fosforo entre otros más, los cuales están involucrados directamente con la planta en su crecimiento y fortalecimiento (38).

2.2.1.1.1 Hongos del género *Trichoderma*.

Este género de hongos se puede encontrar de forma natural en casi todo tipo de suelo y hábitats del planeta, ya que posee cualidades muy beneficiosas para el control de enfermedades en las plantas causadas por determinados patógenos fúngicos (39). La capacidad que tiene a adaptarse a diversas condiciones ambientales y diferentes sustratos le da a la *Trichoderma* la capacidad de ser utilizado en una gran variedad de suelos, cultivos, procesos tecnológicos de reproducción y en diferentes climas, es un hongo anaerobio facultativo y la mayoría de sus colonias presentan un color blanco en su inicio tornándose después a un verde oscuro o amarillo, llega a producir tres tipos de propágulos que son hifas, clamidosporas y esporas “conidias”; estas últimas son las más viables para su propagación y son empleados en programas de biocontrol (40).

La *Trichoderma* tiene una alta capacidad de tolerar un rango amplio de temperatura y distribución ecológica, además de que también tienen a tener un crecimiento rápido (40), por lo que su fácil aislamiento y reproducción hace que muchas empresas apuesten para su comercialización (41).

La clasificación de la *Trichoderma* spp es (42):

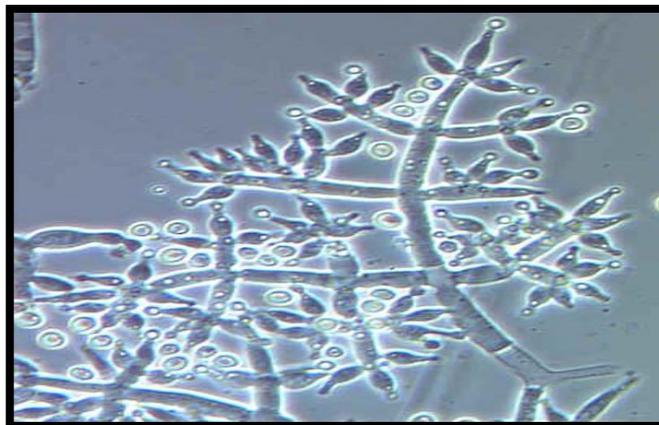
División :	Eumycota
Subdivisión:	Deuteromycotina
Clase:	Hypomicetes
Orden:	Hyphales
Familia:	Monilaceae
Género:	Trichoderma
Especie:	<i>harzianum</i> , <i>hamatum</i> , <i>viride</i> , <i>longibranchiatum</i> , entre otras

La especie más usada de este género de hongo es el *T. Harzianum*, el uso de este hongo en las plantas ha demostrado que hay un aumento en el sistema radicular y de la parte aérea proporcionándole una mayor protección en su momento de trasplante; por lo que podemos decir que el efecto es positivo (43).

Esta especie de la *Trichoderma* tiene como característica el poder aumentar el crecimiento y mejorar desarrollo de la planta, esto se debe a la inhibición de los patógenos menores y también a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta, favoreciendo a la toma de nutrientes del suelo por parte de esta (44). Para cumplir con esta acción biocontroladora tiene mecanismos de acción directos e indirectos, en caso del primer tipo de mecanismo se destaca la antibiosis, generación de compuestos inhibidores del patógeno, secreción de enzimas, micoparasitismo, competencia por nutrientes y espacio con el patógeno; entre los mecanismos indirectos se tiene la detoxificación de la planta de las toxinas, la estimulación a la planta para que genere la capacidad de resiliencia a la infección de los patógenos, solubilidad de nutrientes que en condiciones normales la planta no puede acceder y crea un ambiente favorable para el desarrollo radical que ayudara a la planta a incrementar su tolerancia al estrés (11).

Algunas cepas de *Thichoderma harzianum* llegan a controlar estrictamente a su pH externo para poder asegurar valores óptimos que requieren para sus propias enzimas secretadas. Así mismo también realiza esto con las diferentes proteínas extracelulares que son sintetizadas en los diferentes valores de pH (45).

Figura 2: *Trichoderma harzianum*.



Fuente: (75)

2.2.2 Herbicida

Es un producto químico que se utiliza para evitar el desarrollo de plantas no deseadas o inhibir su crecimiento, estas plantas son comúnmente conocidas como malas hierbas que surgen en terrenos que van ser o ya han sido cultivados.

2.2.2.1 Etimología

Tiene como origen en el latín herba (hierba) y cida (matador, exterminador, “que mata”). Y como malas hierbas, entendemos aquellas plantas que crecen y se desarrollan en un lugar y/o momento no deseado para la agricultura, que es actividad imprescindible que realiza el hombre. Por lo general la mayor parte de estas poseen las mismas características: de fácil dispersión y gran capacidad de resistencia. Entre los problemas que éstas generan encontramos, entre otros, la reducción de la cosecha, provocada por la utilización de recursos, tales como espacio, luz, agua, dedicados a la misma y que por su presencia deben compartir. También afectan a la recolección, dificultando o ralentizando la recogida de la cosecha además de un incremento de costes, ya que si no se tratan a tiempo es necesario combatirlas (46).

Para elegir un herbicida, se tiene en cuenta el estado del cultivo y tipo de maleza que queramos controlar, así como las características físicas del suelo. Los herbicidas se encuentran en el mercado en formulaciones sólidas o formulaciones líquidas que varían según los ingredientes activos y de su forma de aplicación (46).

2.2.2.2 Clasificación de los herbicidas.

Existen diversas formas de clasificación de los herbicidas, ejemplo: por cómo se usan, por propiedades químicas que tienen, por modo de acción entre otros.

- Herbicida total:

Tiene como finalidad el controlar en su totalidad a las malas hierbas existentes, sin discriminación alguna, por ello se usan en la limpieza de los terrenos por lo general que no sean de cultivo; es decir, zonas industriales, carretera etc. (47).

- Herbicida selectivo:

Tiene como finalidad el eliminar una mala hierba en específico, llegando a mantener o preservar el resto de plantas o cultivos con los cuales entro en contacto. La diferencia que tiene con el herbicida total puede llegar a cambiar o invertirse, si el herbicida total es aplicado en dosis muy bajas se convierte en selectivo; de la misma forma con el herbicida selectivo, si es aplicado en dosis muy altas se puede acabar con todo tipo de planta sin discriminación (47).

- Herbicida residual:

Son empleados para la eliminación de las malas hierbas que se encuentran al pie de los árboles, como indica su nombre es aplicado en el suelo directamente, pero no afecta a las malas hierbas que ya se encuentran, si no que a las que estén por germinar (47).

- Herbicida foliar:

También llamado de hoja o follaje, presenta dos tipos: de contacto y sistemático. Se centra en la destrucción de hojas y tallos sin afectar en ningún momento a la raíz de la planta donde se aplica (47).

2.2.2.3 Glifosato.

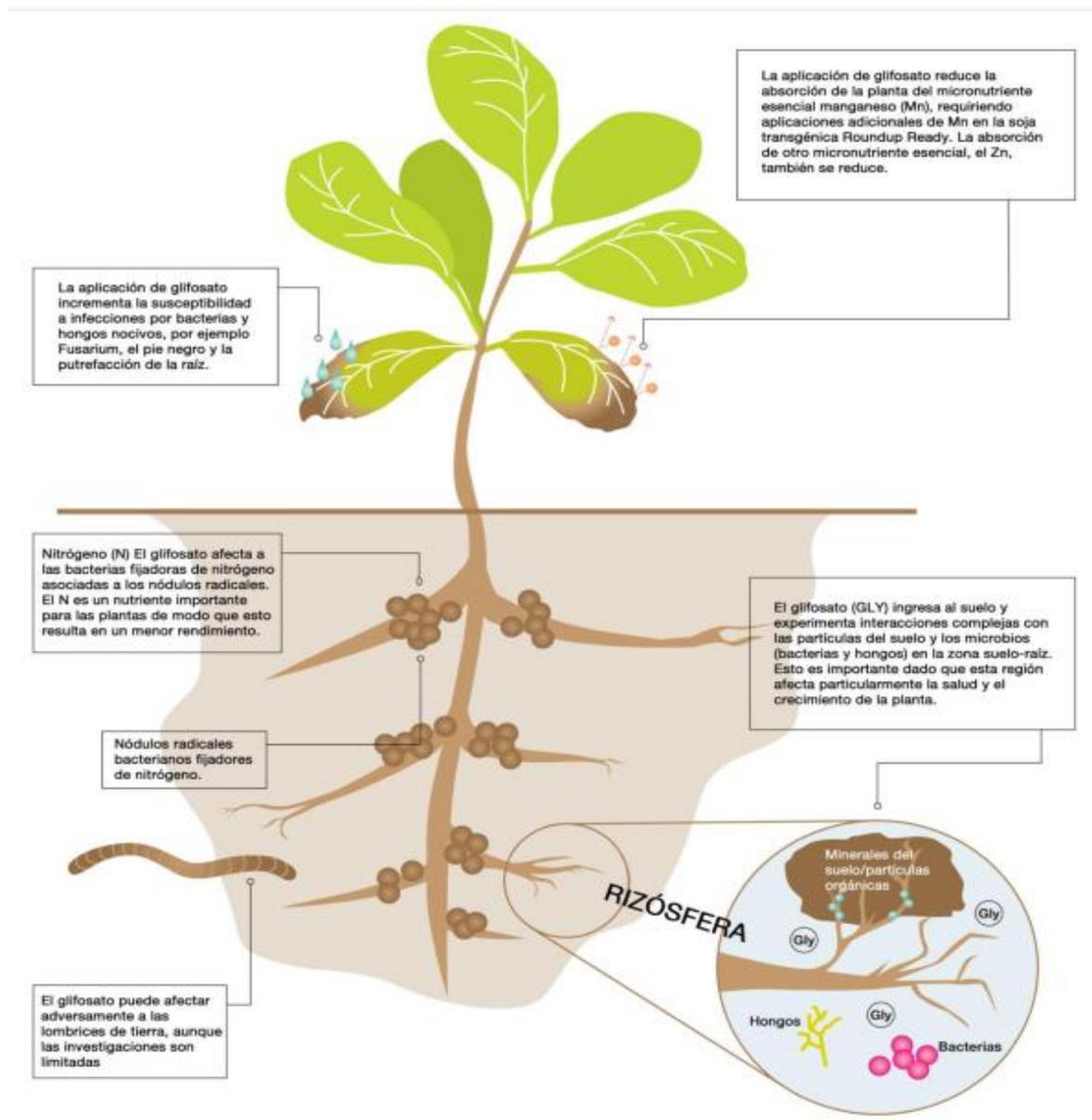
El glifosato, es considerado como un herbicida que no es selectivo y de amplio espectro, que fue descubierto y desarrollado con el fin de eliminar hierbas y arbustos; se le considera como un herbicida total debido a que tiende a erradicar toda vegetación en la zona que fue vertida y disminuir el crecimiento de vegetación en zonas aproximadas. Puede ser aplicado en las hojas, inyectado a troncos y tallos, o asperjarse a tocones como herbicida forestal (8). La efectividad de este compuesto se debe a que suprime la capacidad de generar aminoácidos aromáticos que son usados por las plantas para su crecimiento (8).

Tiene diferentes presentaciones y lo podemos encontrar con diferentes nombres en las cuales se detalla que el componente activo principal es el glifosato, dichas presentaciones mencionan en su mayoría que la dosis usada en campo es L/200L. Al llegar al suelo este compuesto tendría que entrar en un estado inactivo, pero se debe tener cuidado en caso de aplicar en suelos franco arenosos o arenosos, porque estos tipos de suelo no pueden degradar al herbicida lo que conllevaría a que presente una fitotoxicidad al momento de trasplantar cultivos o sembrar (48).

2.2.2.3.1 Glifosato en el sistema suelo – planta.

El impacto que puede ejercer el glifosato en la biodiversidad y en el sistema suelo – planta es de preocupar, se llega esta conclusión debido a todo lo que se ha podido observar en cultivos transgénicos. Esto se da debido a que su impacto o los efectos que pueda producir son directo a la rizosfera, porque al momento de aplicarse este compuesto al suelo va directo a la raíz de las plantas y a todo el entorno de este produciendo así daños en la salud y la absorción de los nutrientes requeridos por las plantas (49).

Figura 3: Interacción planta- suelo del glifosato.



Fuente: (49)

2.2.3 Cultivo de microorganismos.

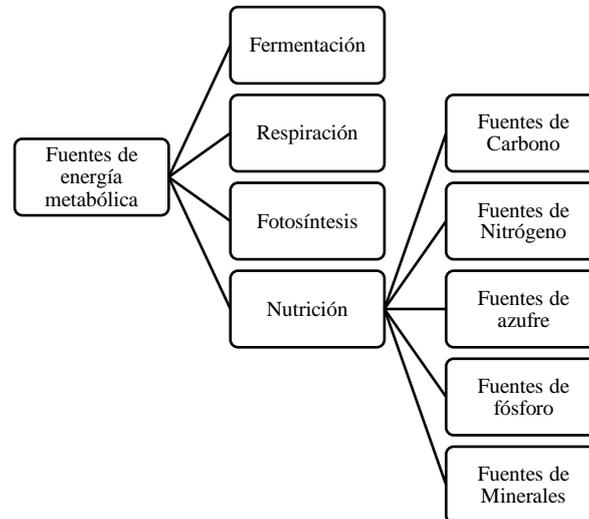
El cultivo o siembra de microorganismos, ya sea en un medio líquido o sólido (agar), requiere de los nutrientes necesarios para la proliferación de este. Esto consiste en que se realice réplicas de sí mismo, debido a la estimulación de su metabolismo por medio de los nutrientes que contiene el medio de cultivo (50).

Durante el cultivo, en específico durante la proliferación del microorganismo se deben controlar ciertos factores como son el pH, los nutrientes, el intercambio iónico, la aeración, la temperatura, entre otros (50).

2.2.3.1 Fuentes de energía metabólica y necesidades para el crecimiento.

Debido a que la mayor parte del peso seco que tiene un microorganismo es materia orgánica, contiene elementos como oxígeno, fósforo, carbono, azufre, nitrógeno e hidrógeno; además también necesita iones inorgánicos como cloruro, calcio, potasio, hierro, sodio y magnesio, que permiten facilitar los diferentes procesos enzimáticos y con ello mantener un equilibrio químico mediante la membrana celular (50).

Figura 4 Fuentes de energía metabólica



Fuente: (50)

2.2.3.2 Factores de Crecimiento.

2.2.3.2.1 Factores Ambientales.

Para el cultivo es muy importante tomar en cuenta los factores ambientales para un correcto desarrollo de los microorganismos. Cuando este obtiene de su entorno el compuesto que requiere que son los factores de crecimiento que pueden ser los siguientes (50):

- Temperatura.
- El pH.
- Nutrientes.
- Aireación.
- Concentración iónica y presión osmótica.

2.2.3.3 Métodos de Cultivo.

Para poder establecer el método de cultivo se toma en cuenta dos cosas muy importantes: el medio de cultivo y el aislamiento de uno o de cada microorganismo.

2.2.3.3.1 Medios de cultivo.

Un medio de cultivo se define como un conjunto de nutrientes, diversos factores de crecimiento y otros componentes más que brindan todas las condiciones necesarias requeridas por los microorganismos. Debido a que cada uno de estos presentan una diversidad metabólica es que existe una gran cantidad de medios de cultivo con notorias diferencias entre ellas, lo que conlleva a que no exista un medio de cultivo universal para todos o para un grupo en particular (51).

Por ello para establecer el medio de cultivo y la técnica a utilizar se tiene en cuenta el tipo de investigación que se realiza o lo que se quiere obtener.

2.2.3.3.1.1 Tipos de medios de cultivo.

Se tiene dos grandes tipos de medios que son los siguientes:

- a) Atendiendo a su estado físico: depende de las características del microorganismo para evaluar si requiere de un medio líquido, semisólido o sólido (52).
- b) Atendiendo a su utilidad práctica: de acuerdo a su utilidad tenemos, también dos sub divisiones medios: aislamientos primarios y medios para identificación de microorganismo (52).

Pero también otros consideran estos tipos de medios de cultivo (51):

- a) Medios generales: permite el desarrollo de una gran variedad de microorganismo.
- b) Medios enriquecidos: permite el desarrollo principalmente de un microorganismo, pero sin inhibir el crecimiento de los otros.
- c) Medios selectivos: permite el desarrollo de un microorganismo en particular e inhibe el crecimiento de otros.
- d) Medios diferenciales: pone en manifiesto las características en particular de algún tipo de microorganismos.

2.2.3.3.1.2 Desarrollo celular de una especie en particular.

En muchas ocasiones los microorganismos que se visualizan en el microscopio tienen un crecimiento y proliferación en un entorno natural, por lo cual, al momento de cultivarlo y generar réplicas de este mediante un cultivo artificial, no siempre responde y realiza lo que nosotros queremos. Por lo tanto, se dificulta el poder cultivar dichos microorganismos, pero esto no quiere decir que sea imposible, si se genera un ambiente adecuado teniendo en cuentas todos los factores ambientales se puede lograr su cultivo (50).

2.2.3.3.1.3 Estudio microbiológico de material natural.

Los materiales naturales contienen una variedad de micro-áreas con diferentes micro-biotas y nichos dentro de estas, por lo cual presentan diferentes características y dominancias los microorganismos pertenecientes o encontrados en estos materiales naturales (50).

Es por esto, que cuando se realiza el cultivo bajo ciertas características y factores solo un grupo selecto o predominante de microorganismo serán los que proliferarán, los que no sean así no podrán desarrollarse. Por ello es recomendable cultivar no solo en una muestra única, si no realizar el cultivo en diferentes agares, con diferentes características y factores que permitan el desarrollo de la mayor cantidad de microorganismo que puedan haber o vivir en el material natural (50).

2.2.3.3.1.4 Aislamiento de un microorganismo en particular.

Si una muestra es manejada correctamente se puede cultivar de esta una gran variedad de microorganismos, si estos tienen características similares o requieren de factores ambientales de crecimiento similares podrán ser aislados y cultivados satisfactoriamente en un medio de cultivo que permita su crecimiento de manera extensiva, con ello permitiendo que las colonias se puedan desarrollar bien y desplazarse para no chocar o invadir a otra (50).

2.2.3.3.1.4.1 Aislamiento de microorganismos en cultivos puros.

Si se estudia una especie de microorganismo en particular de una muestra, es recomendable realizar un aislamiento en un cultivo puro sin otros microorganismos. Se realiza esto con el fin de estudiar y ver el desarrollo de la especie que se estudia de manera independiente (50). Existen varios métodos, pero por lo general se usan los dos que se mencionan a continuación:

- a) Cultivo en placa: se realiza el cultivo del microorganismo en un medio tipo gel, permitiendo que se quede inmóvil, por lo cual al generarse las colonias estas no se mezclan y mantienen una distancia suficiente entre ellas (50).
- b) Dilución: es usado siempre y cuando el cultivo en placa no se pueda llevar a cabo de ninguna forma; de lo contrario no se recomienda el uso de este método, porque para la dilución se requiere realizar diluciones sucesivas de la suspensión, y las muestras que se obtiene de estas son las que se cultivan en placas (50).

2.2.3.3.2 Agares.

Es un elemento solidificante, que se utiliza en la preparación de un medio de cultivo que permite el crecimiento de un microorganismo, para posteriormente identificarlo, así como también sirve para facilitar su crecimiento y estudio (51).

Existe una gran variedad de agares, que se eligen de acuerdo al microorganismo que se cultiva, esto se debe a las diversas características metabólicas que estos tienen, sus necesidades y factores ambientales. Por ello cada agar cumple con ciertas características y condiciones para el cultivo de un tipo de microorganismo en particular (53).

Algunos de ellos son:

- Agar papa dextrosa (APD).
- Agar Sabouraud.
- Agar Macconkey.
- Agar zanahoria, entre otros.

2.2.3.3.2.1 Agar Papa Dextrosa (APD).

Este es un medio recomendado para microcultivos, ya que permite estudiar las características morfológicas de hongos, así como también para el aislamiento de hongos que provienen de fuentes naturales.

Este agar puede llegar a ser suplementado con antibióticos o ácidos, esto con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano o para bajar el pH a 3.5 +/- 0.1 con ácido tartárico al 10% (54).

2.2.3.3.2.2 Agar Sabouraud Glucosado.

El Agar Sabouraud Glucosado es usado para el aislamiento, conservación e identificación de hongos que sean patógenos y saprófitos, pero también puede ser utilizado para el cultivo de levaduras (55).

Tiene un alto contenido de glucosa, también cuenta con la presencia de cloranfenicol y presenta un pH ácido, por lo cual llegan a inhibir el crecimiento bacteriano favoreciendo a la vez el crecimiento de hongo y levaduras. Puede ser suplementado con algún otro agente selectivo de crecimiento (55).

2.2.3.3.3 Métodos de conteo.

2.2.3.3.3.1 Método tradicional.

Este método es el más utilizado en microbiología, consiste en el conteo normal de las colonias, que crecen en el medio de cultivo. Es un conteo simple y sencillo de llevar a cabo utilizando el microscopio.

2.2.3.3.3.2 Métodos específicos.

Se tiene dos grupos dentro de este, depende si se desea realizar el recuento de colonias de microorganismos variables o si es un recuento de colonias de microorganismos totales.

2.2.3.3.3.2.1 Recuento de colonias de microorganismos variables.

Tienen como objetivo evidenciar la presencia y colonización de microorganismos, por lo cual se requiere que el cultivo tenga por lo menos 24h para así poder tener una interpretación de resultados más acertada. Alguno de estos métodos son los mencionados a continuación (56):

- Cuenta en placa:
 - Dilución y conteo en placa.
 - Vaciado en placa.
 - Asa calibrada.
 - Miles y Misra.
 - Filtración.

Nota: En caso de los hongos en particular también se puede realizar el recuento de esporas, mohos y/o levaduras con la siguiente formula (57):

$$RT = CT \times \frac{100}{V}$$

RT = Recuento final.

CT = Conteo total de colonias mohos y levaduras presentes en la superficie de la membrana.

V = Volumen sembrado (en ml).

2.2.3.3.3.2.2 Recuento de colonias de microorganismo totales.

Tiene como objetivo evidenciar la presencia de vivos y muertos, que no pueden ser distinguidos, estos métodos son rápidos, pero requieren para algunos casos el contar con curvas de calibración (56).

- Recuento microscopio
 - Cámaras de Neubauer.

- Cámaras de Petroff-Hausser.
- Cuenta de Breed.

2.3 Definición de términos.

- Agar: elemento de consistencia gelatinosa que está compuesto en particular de azúcar (58).
- Biocontrol: método en el cual se controla plagas, enfermedades y malezas mediante el uso de organismos vivos.
- Bioensayo: “Técnica de valoración biológica basada en el crecimiento de un organismo” (59).
- Concentración iónica: “Es el cociente entre la cantidad de materia iónica de un tipo determinado contenida en un volumen dado de una solución y el volumen” (60).
- Conidias: “son las esporas asexuales no móviles, que llegan a formarse (exógenamente) en el ápice o en el lado de una célula esporógena” (58).
- Degradación: se usa como referencia a una situación por la que un individuo u objeto va reduciendo capacidad, poder, habilidad entre otro. Debido a factores externos a él (61).
- Enterobacterias: bacteria perteneciente a un grupo bacteriano de importancia biológica, debido a que en su mayoría están conformadas por simbiontes del sistema digestivo animal (62).
- Enzima: “Es una molécula que se encuentra conformada principalmente por proteína, siendo su función catalizar las reacciones bioquímicas del metabolismo” (58).
- Fertilizante: “Cualquier material de origen orgánico, inorgánico, natural o sintético que se adiciona al suelo con el fin añadir determinados elementos para el crecimiento de las plantas” (63).
- Glifosato: “Herbicida muy utilizado que ha sido clasificado por la OMS como probablemente cancerígeno” (64)
- Inhibición: “Suspender temporalmente la actividad o función de un organismo, utilizando un estímulo para ello” (58).
- Macrofitas: “Plantas que son acuáticas de gran tamaño que son en contraposición al fitoplancton y otras algas pequeñas macromolécula” (65).
- Microbiota: “Microorganismos que residen en lugares específicos en condiciones específicas cumpliendo funciones específicas también” (58).
- Microorganismo: “Son organismos de muy pequeñas dimensiones que solo se pueden ver en microscopio” (58).
- Mucilaginosas: “Es una sustancia vegetal viscosa, coagulable al alcohol” (66).

- Parcela: “Parte en que se divide un terreno agrícola o urbanizado en el campo” (67).
- Presión osmótica: “Presión aplicada a una solución con el fin de detener el flujo neto de disolvente a través de una membrana semipermeable” (68).
- Sistema radicular: “Es la raíz que tiene el embrión y que da lugar a la raíz primaria después de la germinación” (69).

2.4 Modelo teórico conceptual.

Figura 5: Modelo teórico conceptual.



Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

3.1 Método y alcance de la investigación.

3.1.1 Método de investigación.

3.1.1.1 Método general o teórico de la investigación.

El método inductivo es utilizado para establecer la influencia que tiene el glifosato sobre la reproducción de un microorganismo del suelo el hongo *Trichoderma harzianum*, partiendo de un caso particular para dar una conclusión general; es decir determinar si la variable independiente, el glifosato en las diferentes concentraciones tiene una influencia negativa sobre la variable dependiente, el hongo *T. harzianum* en específico sobre su reproducción (70). El método cuantitativo es usado porque los datos recolectados después del ensayo son numéricos y son medidos y; analizados para dar resultados objetivos.

3.1.1.2 Método específico de la investigación.

El método experimental es aplicado en todo el procedimiento, por desconocerse los resultados a obtener. En la investigación se realizará un pre-ensayo y un ensayo para la recolección de datos, se trabaja con dos grupos, un testigo o de control y el otro experimental, para predecir lo que está pasando en la realidad o va a pasar en el futuro (70).

3.1.2 Alcance de la investigación.

3.1.2.1 Tipo de investigación.

El tipo de investigación es aplicada, está basada en resolver un problema, en este caso la influencia de este herbicida en un microorganismo específico del suelo y resolviéndolo mediante la realización de un experimento teniendo así una respuesta al problema encontrado (70).

3.1.2.2 Nivel de investigación.

El nivel de investigación es predictiva o experimental, se busca determinar la influencia de la variable independiente sobre la variable dependiente requiriéndose de un experimento, en el cual se dan condiciones o características uniformes a la muestra, y se tiene dos grupos, uno de control y otro donde se aplican las diferentes dosis (70).

3.2 Diseño de la investigación.

La presente investigación hace uso del diseño experimental, ya que se somete a la variable dependiente (hongo *Trichoderma harzianum*) a diferentes concentraciones del

glifosato (variable independiente), todo esto bajo condiciones controladas en laboratorio desconociéndose los resultados que se puedan obtener en el ensayo (71).

3.2.1 Tipo de diseño de investigación.

La investigación presenta un diseño experimental y tiene la siguiente forma (71):

- Variable dependiente: *Trichoderma harzianum*,
- Variable independiente: Glifosato.

EXPERIMENTAL

$GE: O_1 X O_2$

Donde:

- ❖ G.E: influencia del glifosato en el hongo *Trichoderma harzianum* proveniente de *Rhizoctonia solania* del cultivo de algodón.
- ❖ O_1 : pre test
- ❖ O_2 : test
- ❖ X: manipulación de la variable independiente.

3.3 Población y muestra.

3.3.1 Población.

El suelo de cultivo cuenta con una extensa población de microorganismos, dividiéndose en cinco grandes grupos. Uno de estos grupos que cumple con un rol importante son los hongos. En esta investigación, la población está conformada por los hongos, microorganismos del suelo sobre los cuales hay contacto de forma directa o indirecta con el glifosato.

3.3.2 Muestra.

La elección de la muestra fue no probabilística y se seleccionó por conveniencia al hongo del género *Trichoderma* de la especie *harzianum*, este hongo se puede encontrar en todo tipo de suelos en particular y en mayor proporción en suelos de cultivo, a diferencia de otras especies del género *Trichoderma*.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

3.4.1 Técnicas de recolección de datos.

La técnica seleccionada para la recolección de datos en esencia es la observación estructurada, se establecen las dosis, se prepara los medios de cultivo y se realiza el ensayo, la evaluación mediante observación paulatina y constante de las diferentes replicas con las diferentes concentraciones; y el conteo de las placas con la cámara de Neubauer.

3.4.2 Instrumentos de recolección de datos.

Para recoger los datos del experimento se cuenta con fichas de observación, que nos permite estar atentos a los cambios que se producen en las réplicas debido a la exposición a diferentes concentraciones del glifosato, también nos permite mantener un control sobre estas y su evolución. Cada ficha tiene un objetivo y función como tal, facilita la obtención y posterior análisis de los datos recabados en la investigación.

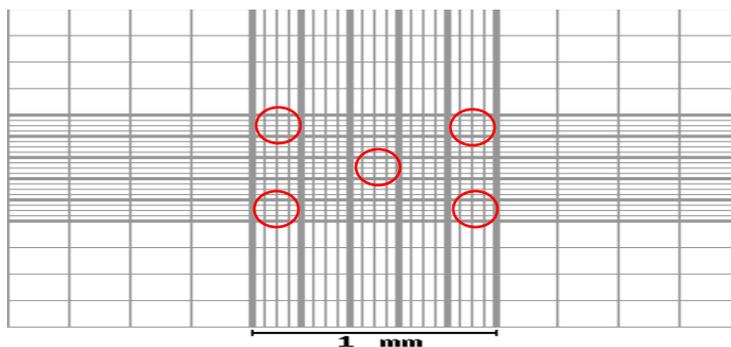
En el *Anexo 4* se encuentra la ficha 1, utilizada para recoger datos de la muestra control, esta ficha es muy importante, nos indicara el crecimiento normal del hongo sin tener ningún contacto con el glifosato y proporciona datos de referencia sobre el crecimiento normal del hongo *Trichoderma harzianum*.

Para evaluar las dosis en las respectivas réplicas del hongo se utiliza otra ficha la cual considera el total de réplicas por dosis, dicha ficha está en el *Anexo 5 Ficha 2*. En esta ficha se describirá a detalle todo lo observado en un tiempo establecido.

Para obtener el número de conidias se requiere realizar un conteo de los microorganismos totales, se usa de preferencia la cámara de Neubauer (72). Esta cámara es de conteaje en microscopio cuenta con 5 áreas para conteo dependerá de que microorganismo se quiera contar para elegir las áreas que se requieren y la forma, en este caso el conteo de conidias se realiza en el cuadrante central ubicado en la zona media y se cuentan los 4 cuadrados de las esquinas y el cuadrado central, haciendo un total de 5 cuadrados, tal como se muestra en la *Figura 8*.

Se debe contar todas las conidias que puedan estar dentro del cuadrado, así como también las que están en las líneas de los bordes superior e izquierdo, no se debe tomar en cuenta las que se encuentren fuera (72).

Figura 6: Cámara de Neubauer



Fuente: (73)

Se llega de preferencia a una dilución de 10^{-2} y se agita por un minuto en el vórtex. Para contar los 5 como se muestra en la *Figura 6* y determinar el número de conidias por ml se utilizó la siguiente fórmula (72):

$$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = X * 5 * 10^4 * ID$$

$5 = N^{\circ} \text{ de cuadraditos contados en el cuadrante.}$

$X = \text{Promedio de conidias contadas.}$

$ID = \text{Inversa de la dilución empleada.}$

✚ Para obtener el N° de conidias totales se hace lo siguiente:

$$N^{\circ} \text{ de conidias totales} = N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{conidias}}{\text{ml}} * \text{Volumen de la concentración original.}$$

3.5 Procedimiento de la investigación.

Se adquirió el hongo *Trichoderma harzianum* del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), se usa como control biológico con código CCB-LA101 proveniente de la *R.solania* del cultivo de algodón, así mismo se adquirió el herbicida “Fuego” de un 1L, tiene como componente activo al Glifosato (480g/L) con una dosificación de aplicación en campo recomendada de 1L/200L. Para realizar el ensayo como se ve en la *Figura 7* se estableció el rango de las dosis partiendo de la recomendada por el fabricante del producto, por ello se realizó un ensayo preliminar con la dosis de 1ml de glifosato. Se estableció una dosis menor de 0.75 ml y una dosis mayor de 1.25 ml. Se prepararon 8 placas con medios de cultivo agar papa dextrosa (APD), dos placas son la muestra control y el resto contendrán dosis de glifosato, teniendo dos placas por dosis, se sembró en esta el hongo e incubo por 5 días; se observó una disminución del número de conidias del hongo en las seis placas que contenían glifosato.

A partir de los resultados de la prueba preliminar se estableció como dosis media 1 ml de Glifosato, dos dosis menores de 0.50 ml y 0.75 ml y dos dosis mayores de 1.25 ml y 1.50 ml. Se activó la cepa del hongo en un medio de cultivo que favorece su crecimiento que es el APD, este medio es sencillo de preparar solo se requiere de papa, dextrosa, agar, agua destilada y un antibacteriano, este último es debido a que no es un medio selectivo y por eso se aplica un antibacteriano para que solo crezca en la placa el hongo. Para preparar el APD se lavó y cortó papa en cuadrados pequeños, se hizo hervir en agua destilada por 35 minutos, con la intención de que suelte todo el almidón que contenga, se filtró el caldo de papa en un matraz y se agregó agar, dextrosa y el antibacteriano, quedando lo más homogéneamente posible. Se hizo un tapón e ingresó a autoclave, es necesario precisar que para aquellos matraces que son para las dosis se les

agregó glifosato; y se etiquetó para no confundirlos entre ellos o con el que contenía el agar para la muestra control. Se retiró los matraces de la autoclave una vez culminado el tiempo requerido y se vertió el agar en las placas de vidrio esterilizadas, se enfrió los matraces y se sembró el hongo.

Para la activación del hongo se extrajo con una pinza de punta fina correctamente esterilizada y enfriada con alcohol una hojita con el hongo del frasco con silica gel, se colocó en la placa, con el medio de cultivo, y se vertió sobre ella tres gotas de agua destilada. Transcurrido 3 minutos, con el asa de siembra se sembró por arrastre. Se debió sellar la placa e incubó por 5 días.

Con las placas listas y el hongo activado se procedió a realizar el sembrando, se cogió la placa que tiene al hongo activado y con una aza de siembra correctamente esterilizada se tomó un poco del hongo y se realizó un punto en medio de la placa; se realizó lo mismo con las 66 placas, después fueron selladas y etiquetadas. La etiqueta contenía la fecha de sembrado, la fecha de retiro de la placa de la incubadora, el número de la réplica y la dosis de glifosato que contenía. Se llevó todas las placas a la incubadora y se dejó por 5 días para que el hongo crezca a una temperatura de 25°C, culminado este tiempo se retiró de la incubadora y se procedió a realizar el conteo con la cámara de Neubauer.

Figura 7: Modelo de procedimiento realizado.

Preparación de diluciones	Toxico de referencia Glifosato			Agua destilada	
					
N° diluciones	0.50ml 	0.75ml 	1ml 	1.25ml 	1.50ml 
<i>Trichoderma harzianum</i>					
Control					
Replica 1°					
Replica 2°					
Replica 3°					
Replica 4°					
Replica 5°					
Replica 6°					

Replica 7°	●	●	●	●	●
Replica 8°	●	●	●	●	●
Replica 9°	●	●	●	●	●
Replica 10°	●	●	●	●	●

Fuente: *Elaboración propia.*

El tiempo referencial fue de 5 a 7 días y se tomó en cuenta los siguientes protocolos de cultivo de este hongo en particular:

- ❖ Ejercen la función de biocontrol de dos formas, indirecta (competencia de nutrientes, espacios, producción de metabolitos; mejorando las condiciones ambientales o generando sustancias que promuevan la producción de sustancia benéficas para el crecimiento vegetal) o directa (micoparasitismo) (41).
- ❖ Se debe usar un microscopio para el control de la cantidad de esporas, en caso no haya ningún tipo de conservante debe estudiarse lo más rápido posible luego de realizar la producción. Se recomienda no más de tres días bajo ambientes controlados en temperatura (74).

A. Materiales

- Muestra (*Trichoderma harzianum*).
- Glifosato.
- Agar-agar.
- Dextrosa o glucosa.
- Papa.
- Pipeta.
- Pro pipeta.
- Probeta.
- Matrices aforados de igual capacidad.
- Asas de siembra.
- Cajas Petri (66).
- Mechero.
- Vasos precipitados.
- Cocinilla.
- Algodón.
- Alcohol.
- Gasa.
- Agua destilada.
- Varilla.
- Pinza estéril.
- Gotero.
- Cinta masking.
- Frascos.
- Bolsas de plástico para ingresar los materiales a autoclave.
- Cucharilla de metal.

B. Equipos.

- Microscopio óptico con aumento de 40x.
- Autoclave.

- Cámara de Neubauer.
- Vórtex.

Para la recolección de datos se contó con dos fichas (*Ver Anexo 4 y 5*), que fueron diseñadas para adquirir todos los datos para ser analizarlos y poder comprobar la hipótesis de la investigación utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de Duncan, con ambas pruebas se buscó establecer si hay una influencia negativa por parte del glifosato hacia el hongo o si de lo contrario este compuesto no tiene ninguna influencia negativa sobre este (*Ver Figura 8*), así como también tener una noción de los daños ambientales que genera el uso desmesurado de este herbicida en nuestro país.

Figura 8: Relación glifosato – microorganismos del suelo.



Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV

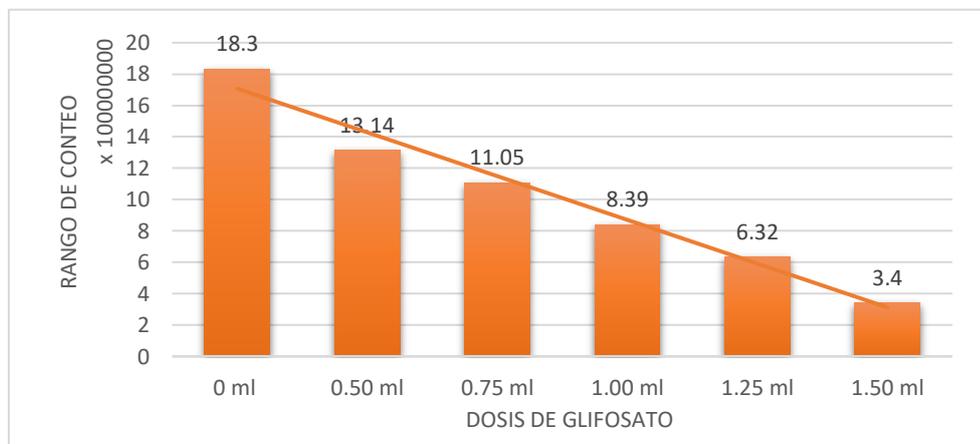
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Resultados del tratamiento y análisis de la información.

Al concluir con el experimento y mediante los instrumentos de recolección de datos se obtienen los siguientes resultados, cada dosis y la muestra control tuvo 11 réplicas cada uno. El control tiene como dato de mayor valor 19.75×10^8 , esto contrasta en gran medida con los datos de las dosis, en 0.50 ml y 0.75 ml se tuvo 13.75×10^8 y 12.25×10^8 respectivamente, en caso de la dosis de 1ml el dato de mayor valor es 9.50×10^8 que llega a ser casi la mitad del obtenido en la muestra control.

La dosis de 1.25 ml tiene como mayor valor 6.75×10^8 y en 1.50 ml el mayor valor es 4×10^8 , estos valores son muy bajos en comparación a la muestra control (*Ver tabla 10 – Anexo 11*).

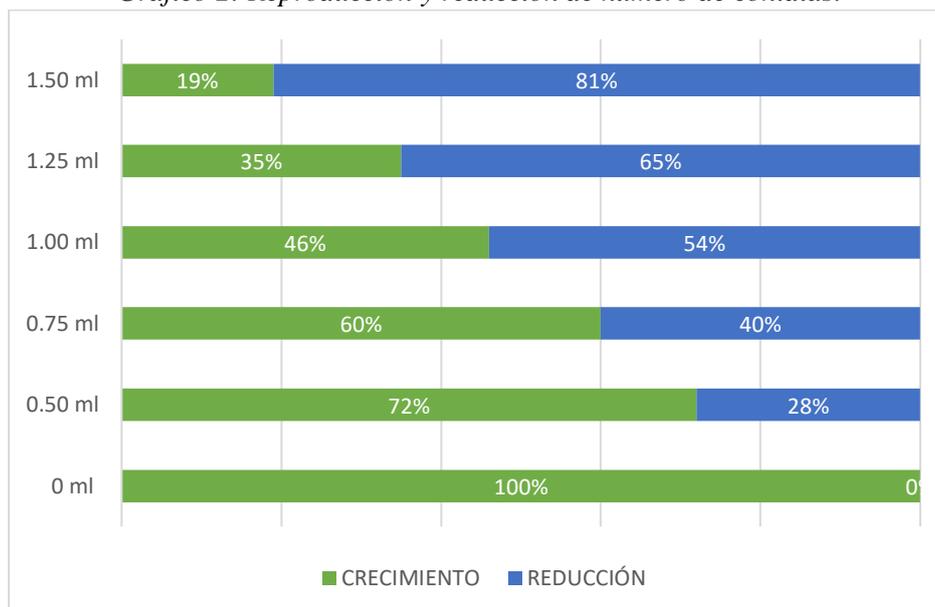
Gráfico 1: Resultados generales.



Fuente: Elaboración propia - Excel 2016.

Se observa que las barras van disminuyendo, según la dosis se incrementa presentando una línea de tendencia descendente. Al comparar la media de los valores obtenidos de la muestra control que representa el número de conidias totales del crecimiento normal del hongo es 18.3×10^8 , con las respectivas medias de las diferentes concentraciones de glifosato, como se puede ver en el *Gráfico 1*, la dosis de 1.50 ml tiene 3.4×10^8 conidias totales, que comparado con el control, presenta una disminución muy significativa. Así mismo se puede apreciar que las otras cuatro concentraciones tienen disminución considerable en el número de conidias totales.

Gráfico 2: Reproducción y reducción de número de conidias.



Fuente: Elaboración propia - Excel 2016.

Las dosis utilizadas no causan la muerte del hongo, sin embargo, ocasionan una disminución en el número de conidias siendo más evidente con la muestra control (*Gráfico 2*). La muestra control (0 ml) representa el número de conidias al 100% y al ser comparada con lo obtenido en cada dosis se aprecia una disminución continua. La dosis de 1.00 ml, sacada de la recomendada por el fabricante, tiene una reducción del 54 % del número de conidias, así mismo, la reducción que presenta la dosis de 1.50 ml es la más preocupante ya que llega a disminuir en un 81% el número de conidias.

4.2 Comprobación de la Hipótesis.

Para la comprobación de la hipótesis se realizó primero la prueba de normalidad para determinar qué tipo de distribución presentan los datos.

Tabla 1: Prueba de normalidad.

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Muestra control	,893	11	,151
Dosis de 0.50 ml de Glifosato	,887	11	,126
Dosis de 0.75 ml de Glifosato	,763	11	,003
Dosis de 1.00 ml de Glifosato	,904	11	,205
Dosis de 1.25 ml de Glifosato	,791	11	,007
Dosis de 1.50 ml de Glifosato	,915	11	,277

Fuente: Elaboración propia – IBM SPSS 25

Con un nivel de significancia de 0.05 y teniendo un tamaño de muestra menor a 50 en los diferentes grupos de estudios, corresponde analizar los resultados obtenidos en Shapiro-Wilk. Los datos que se tiene de la muestra control y de las dosis de 0.50 ml, 1 ml y 1.50 ml presentan una distribución no normal, debe que el nivel de significancia que tienen es mayor a 0.05 y se tiene solo dos dosis (0.75 ml y 1.25ml) que sus datos presentan en distribución normal. Por lo tanto, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y la prueba de rangos de Duncan.

4.2.1 Comprobación de hipótesis general.

Para comprobar la hipótesis general se usa la prueba de Kruskal-Wallis.

Ho: el glifosato no influye en la reproducción de *Trichoderma harzianum* debido a que no disminuye sus propágulos mediante conidias.

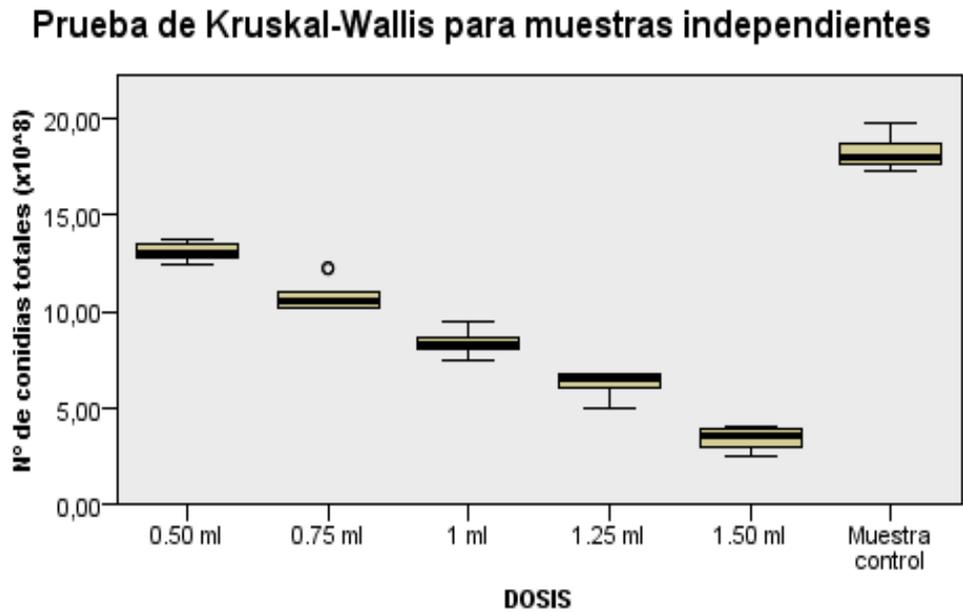
Hi: el glifosato influye en la reproducción de *Trichoderma harzianum* debido a que disminuye sus propágulos mediante conidias.

Tabla 2: H de Kruskal-Wallis (dosis de glifosato - conteo de conidias de la *T.harzianum*).

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	N° de conidias totales
H de Kruskal-Wallis	48,833
gl	1
Sig. asintótica	,000
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupación: Dosis	

Fuente: Elaboración propia – IBM SPSS 25.

Figura 9: Diagrama de cajas y bigotes.



Fuente: Elaboración propia – IBM SPSS 25.

Se tiene un nivel de significancia de 0.00 que es menor al nivel de significancia de la investigación (0.05), por lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de la investigación: “El glifosato influye en la reproducción de *Trichoderma harzianum* debido a que disminuye sus propágulos mediante conidias”.

4.2.2 Comprobación de hipótesis Específicas.

Para la comprobación de la hipótesis específica se utiliza la prueba de Duncan.

- Hipótesis específica 1.

Ho: las concentraciones de 1.25 ml y 1.50 ml de glifosato no disminuyen significativamente el número de conidias de *Thichoderma harzianum*.

Ha: las concentraciones de 1.25 ml y 1.50 ml de glifosato disminuyen significativamente el número de conidias de *Thichoderma harzianum*.

Tabla 3: Prueba de Duncan.

Test:Duncan Alfa=0.05
 Error: 0.4316 gl: 60

DOSIS	Medias	n	E.E.	
1.50	3.41	11	0.20	A
1.25	6.32	11	0.20	B
1.00	8.39	11	0.20	C
0.75	10.84	11	0.20	D
0.50	13.14	11	0.20	E
0.00	18.30	11	0.20	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Fuente: Elaboración propia – InfoStat.

El resultado de cada dosis esta de forma ascendente, iniciando con la dosis que tiene una media baja hasta culminar con la muestra control que tiene una media alta. Se puede apreciar que las medias de cada una de la dosis y la muestra control tienen diferentes letras ubicadas en columnas distintas, lo que implicaría que hay una diferencia significativa entre ellas, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna: “Las dos concentraciones de 1.25 ml y 1.50 ml de glifosato disminuyen en gran cantidad el número de conidas del hongo *Trichoderma harzianum*”. Así mismo, como se puede apreciar en la *Tabla 3* las dosis de 0.50 ml, 0.75 ml y 1.00 ml disminuyen en diferentes proporciones el número de conidias.

4.3 Discusión de los resultados.

Los resultados obtenidos en el conteo de conidias demuestran, que existe una disminución paulatina de conidias del hongo debido al glifosato (Gráfico N°1). El efecto de este herbicida fue evaluado también en hongos nativos de *Trichoderma spp* con dos diferentes concentraciones: 4800ppm y 1440ppm, las cuales disminuyeron el número de conidias (33). Aunque el tiempo de evaluación varía de 24 h en comparación con los 5 días evaluados en esta investigación, este factor no jugó un rol determinante, porque los resultados demuestran que el glifosato tiene una influencia sobre este hongo. Asimismo, el glifosato suprime la capacidad de generar aminoácidos aromáticos útiles para el crecimiento de las plantas (8), además que inhibe la producción de conidias que son el medio más viable para la propagación o reproducción del hongo (40),

Se evaluó los efectos del glifosato en las abejas llegando a la conclusión que el herbicida no las mata en el acto, pero si tiene un efecto negativo en su microflora intestinal generándoles en el tiempo, la muerte (16). La *Trichoderma harzianum* presenta similar comportamiento, es decir las dosis propuestas en la investigación no son letales, sin embargo, tienen una influencia marcada en el conteo de conidias. El efecto de este

herbicida también fue evaluado haciendo una simulación de lo que estaría ocurriendo con el glifosato en el campo, utilizando una dosis de 5 mg/L y 10 mg/L superiores a los niveles ambientales de glifosato de EE. UU y oscilan entre 1.4 y 7.6 mg/L (16). En Perú solo se cuenta con el dato de dosis que se aplican a los cultivos L/200L o 450 mg/L, sin embargo, las dosis que se usan en EE. UU son menores en comparación con Perú y esto puede ser una variable determinante para las proyecciones de ambas investigaciones incluso al momento de compararlas.

El efecto del glifosato sobre diferentes hongos del suelo, como los hongos micorrícicos arbusculares que fueron expuestos directa e indirectamente al compuesto teniendo como resultado que hay una afectación en estos (17); así mismo el efecto del herbicida en hongos endófitos de la raíz de la *Epidendrum melinanthum* teniendo el mismo resultado que el anterior (21). Ambas investigaciones trabajaron con diferentes concentraciones a partir de la usada en campo, ya sea que se haya establecido tres dosis como tal como el caso del primero o solo una dosis que fue diluida tres veces y aplicada dichas diluciones en 30 réplicas. Todas las dosis de glifosato usadas en las diferentes investigaciones antes mencionadas tienen una influencia negativa siendo notorio en unos más que otros; en caso específico *Trichoderma harzianum* se comprueba la repercusión en el conteo de las conidias, algo que es perjudicial para la subsistencia del hongo a largo plazo. Teniendo en cuenta sólo las dos últimas investigaciones se llegan a apreciar que el glifosato está generando efectos negativos en los hongos del suelo, lo que se pudo observar también en esta investigación y que suma a *Trichoderma harzianum* a la lista de hongos afectados ya sea directamente o indirectamente por el compuesto.

La dosis de 1 ml de Glifosato se toma a partir de la dosis recomendada para la aplicación en campo según la ficha técnica del herbicida (48), el cual disminuye un 54% el número de conidias, que es casi la mitad el número de conidias con respecto a la muestra control y esto se observa en todas las dosis, incluidas las dosis menores (Gráfico 2). Por lo tanto, las dosis probadas en la investigación inhiben el crecimiento del hongo en diferentes proporciones (Tabla 3), lo que significa a su vez que la dosis recomendada por el fabricante tiene el mismo efecto negativo en el hongo *Trichoderma harzianum*.

En las interacciones microbiológicas de las rizosferas de la soja GR1 Y GR2 se aplicó diferentes concentraciones de glifosato y se obtuvo como resultado que este herbicida tiene un impacto perjudicial en las interacciones complejas que tienen los microorganismos (19) y también en la microfauna del suelo de cultivo de café. Se llega a la conclusión que este compuesto no presenta un efecto directo en la cantidad de microorganismos, pero que sí afectaba de forma indirecta en sus principales funciones

muy importantes para la salud y calidad del suelo (30). Las investigaciones mencionadas y esta investigación demuestran que el glifosato no llega a ser letal, pero es evidente el impacto perjudicial que tiene en el suelo y por lo tanto sobre los cultivos producidos.

CONCLUSIONES

Se observa un decrecimiento en el conteo de conidias de todas las repeticiones y concentraciones utilizadas, provocado por el glifosato, lo que significa que este tiene una influencia negativa sobre el hongo estudiado. Las conidias son el tipo de propágulo que garantiza la fase sexual de la reproducción de *Trichoderma harzianum*, por lo tanto, su viabilidad y acción es benéfica sobre el suelo.

La dosis de 1.25 ml y 1.50 ml tienen una influencia negativa en el número de conidias debido a que disminuyen el número de conidias en 81 % y 65 % respectivamente. Así mismo las dosis de 0.50 ml, 0.75 ml y 1 ml tienen también una influencia negativa en el número de conidias, por lo que se puede afirmar que todas las dosis utilizadas en la investigación en especial las dos dosis mayores disminuyen significativamente el número de conidias del hongo y tiene una influencia negativa sobre este.

Las dosis usadas en la investigación surgen a partir de la usa para los cultivos (1L/200L) lo que significaría que esta no es buena para *Trichoderma harzianum* ya sea en su forma nativa o introducida como control biológico y por ello se requiere una dosis menor a 0.50 ml para evitar perjudicar al hongo.

RECOMENDACIONES

Es recomendable que se añada al medio de cultivo APD un inhibidor bacteriano si se quiere cultivar hongos, es un medio no selectivo y se quiere evitar la contaminación de las placas.

El hongo *Trichoderma harzianum* para que tenga un crecimiento adecuado, requiere un medio de cultivo enriquecido, por ello se debe agregar glucosa en la misma proporción que agar para lograr esto.

No es recomendable mantener por mucho tiempo las placas con el medio de cultivo en la refrigeradora, tiende a cristalizarse con rapidez.

Se recomienda experimentar con dosis menores a 0.50 ml para establecer así una concentración que no sea perjudicial para el hongo y poder corregir la dosis recomendada por el fabricante.

Para complementar este estudio es necesario evaluar las dosis letales y no letales, las aplicadas en esta investigación, no presentaron inhibición total del crecimiento de conidias.

BIBLIOGRAFIA

1. LA NACION. Historia y evolución de las malezas y herbicidas - LA NACION. [online]. 2007. [Accessed 19 September 2018]. Available from: <https://www.lanacion.com.ar/964964-historia-y-evolucion-de-las-malezas-y-herbicidas>
2. GLYPHOSATE FACTS. Historia del glifosato. [online]. 2013. [Accessed 19 September 2018]. Available from: <https://www.glifosato.es/historia-del-glifosato>
3. ASOCIACIÓN DE CONSUMIDORES ORGÁNICOS. *FICHA TÉCNICA DEL GLIFOSATO* [online]. [no date]. [Accessed 11 July 2019]. Available from: <https://consumidoresorganicos.org/wp-content/uploads/2017/07/FICHA-TÉCNICA-DEL-GLIFOSATO.pdf>
4. BBC NEWS MUNDO. Demanda a Monsanto: Bayer insiste en que “el glifosato es seguro y no causa cáncer” - BBC News Mundo. [online]. 2018. [Accessed 19 September 2018]. Available from: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-45157068>
5. LA REPÚBLICA. Glifosato en Perú: Alerta en los cultivos. [online]. 2018. [Accessed 11 July 2019]. Available from: <https://larepublica.pe/domingo/1300946-dom19artglifosato/>
6. GARNICA, Amira and SARAÍ, Reynoso. TRICHODERMA: UN HONGO BIOFERTILIZANTE. *Saber Mas, Revista de divulgación* [online]. Available from: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/267-numero-31/482-trichoderma-un-hongo-biofertilizante.html>
7. C.D/AGENCIAS. Glifosato: qué es y cómo afecta a la salud. [online]. 2017. Available from: <https://www.diarioinformacion.com/vida-y-estilo/salud/2017/11/29/glifosato-afecta-salud/1963055.html>
8. NO MÁS VENENOS EN CANARIAS. ¿Qué es el glifosato? [online]. 2011. [Accessed 19 September 2018]. Available from: <https://nomasvenenosencanarias.wordpress.com/que-es-el-glifosato/>
9. GREENPEACE ESPAÑA. Glifosato. [online]. 2018. [Accessed 19 September 2018]. Available from: <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/agricultura/glifosato/>
10. DUVAL, MATÍAS; LOPEZ, FERNANDO; MARTÍNEZ, JUAN M.; IGLESISAS, JULIO; GALANTINI, JUAN A.; WALL, Luis. Evaluación de la calidad de suelos agrícolas por medio de índices. *Boletín del CERZOS*. 2014.
11. INFANTE, Danay, MARTÍNEZ, B, GONZÁLEZ, E and GONZÁLEZ, Noyma. MECANISMOS DE ACCIÓN DE Trichoderma FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Revista de Protección Vegetal* [online]. 2009. Vol. 24, no. 1, p. 14–21. [Accessed 17 February 2020]. DOI 1010-2752. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002
12. RUMBOS, Redacción. Atención Perú: un herbicida peligroso anda suelto en los cultivos. [online]. 2018. Available from: <https://www.rumbosdelperu.com/ambiente/13-09-2018/atencion-peru-un-herbicida-peligroso-anda-suelto-en-los-cultivos/>
13. SAMPER, María. Fumigar con glifosato, un desastre social y ambiental - ELESPECTADOR.COM. [online]. 2015. [Accessed 11 July 2019]. Available from: https://www.elespectador.com/opinion/fumigar-con-glifosato-un-desastre-social-y-ambiental-columna-553149?fbclid=IwAR1WXuJ29cOUoR_uqHDL2aNNZdICe-EQz2dn_YGtKs3SCIFbQVo-EdxsuVc

14. EL TIEMPO. Glifosato tiene efectos nocivos para la salud según exministro - Cortes - Justicia - ELTIEMPO.COM. [online]. [Accessed 12 July 2019]. Available from: <https://www.eltiempo.com/justicia/cortes/glifosato-tiene-efectos-nocivos-para-la-salud-segun-exministro-335124>
15. KIENYKE. El glifosato representa un peligro ambiental. [online]. 2019. [Accessed 11 July 2019]. Available from: <https://www.msn.com/es-co/noticias/colombia/el-glifosato-representa-un-peligro-ambiental/ar-BBUpMn2?fbclid=IwAR2Z94yAtP8AbTi340-fVfsBRB2Ryg04px6V9GSS4EZ7vriW7GBWknZdsds>
16. MOTTA, Erick V S, RAYMANN, Kasie and MORAN, Nancy A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. . 2018. Vol. 115, no. 41, p. 10305–10310. DOI 10.1073/pnas.1803880115.
17. DRUILLE, Magdalena. *Efectos directos e indirectos del herbicida glifosato sobre los hongos micorrízicos arbusculares en pastizales de la Pampa Deprimida*. Universidad de Buenos Aires, 2014.
18. TOFIÑO RIVERA, Adriana Patricia, CARBONO MURGAS, Rafael Enrique, MELO RÍOS, Aslenis Emidia and MERINI, Luciano José. Effect of glyphosate on microbiota, soil quality and biofortified bean crop in Codazzi, department of Cesar, Colombia. *Revista Argentina de Microbiología*. 2019. P. 11. DOI 10.1016/j.ram.2019.01.006.
19. ZOBIOLE, L.H.S., KREMER, R.J., OLIVEIRA, R.S. and CONSTANTIN, J. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology* [online]. January 2011. Vol. 110, no. 1, p. 118–127. [Accessed 7 November 2019]. DOI 10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x>
20. LÓPEZ-FERRER, Úrsula del Carmen, BRITO-VEGA, Hortensia, LÓPEZ-MORALES, David, SALAYA-DOMÍNGUEZ, José Manuel and GÓMEZ-MÉNDEZ, Edmundo. Trichoderma ROLE IN AGROFORESTRY-CACAOTAL SYSTEMS AS AN ANTAGONAL AGENT. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* [online]. 2017. Vol. 20, no. 1, p. 91–100. DOI 10.1517/13543770902755129. Available from: <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2278>
21. PEREA-MORERA, Erika and TUPAC OTERO, Joel. EFECTO DEL HERBICIDA GLIFOSATO EN HONGOS ENDÓFITOS DE RAÍZ Y KEIKIS DE EPIDENDRUM MELINANTHUM (ORCHIDACEAE). *LANKESTERIANA* [online]. 2016. Vol. 16, no. 2, p. 269–278. [Accessed 7 November 2019]. DOI 10.15517/lank.v16i2.26011. Available from: <http://dx.doi.org/10.15517/lank.v16i2.26011>
22. GONZÁLEZ, LTarsicio Santana Díaz y Leónides Castellanos. EFECTO BIOESTIMULANTE DE Trichoderma harzianum Rifai en las plántulas de Leucaena. *Colombia Forestal*. 2018. Vol. 21, no. 1, p. 81–90.
23. CABRERA MIRANDA, I. Uso de Trichoderma harzianum Rifaii para el control biológico de Sclerotium rolfsii Sacc. en el cultivo de zábila (Aloe vera L.). *KOINONIA. Revista Arbitrada Interdisciplinaria de Ciencias de la Educación, Turismo, Ciencias Sociales y Económica, Ciencias del Agro y Mar y Ciencias Exactas y aplicadas*. 2017. Vol. II, no. 3, p. 180–193.
24. POALACIN, Juana. *ESTUDIO DEL ADECUADO CRECIMIENTO DEL HONGO TRICHODERMAHARZIANUM Y TRICHODERMA HAMATUM EN SUSTRATO SÓLIDO*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, 2015.
25. ROJAS, Noe. *EFECTO DE Trichoderma harzianum SOBRE EL FRUTO DE TOMATE*. UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR, 2014.

26. MARTÍNEZ, B, INFANTE, Da and REYES, Y. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*. 2013. Vol. 28, no. 1, p. 1–11.
27. VÁZQUEZ, Julián. *CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y PRODUCCIÓN DE Trichoderma harzianum Y Trichoderma viride EN UN CULTIVO ARTESANAL* [online]. Javeriana, 2010. [Accessed 15 June 2019]. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8662/tesis615.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
28. CUBILLOS-HINOJOSA, Juan and VALERO, Nelson. Trichoderma harzianum como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var . *flavicarpa* Degener) Trichoderma harzianum as a plant growth promoter in yellow. . 2009. Vol. 27, no. 1, p. 81–86.
29. RAMOS, Miriam. *Efecto del Glifosato sobre las propiedades del suelo de una planta forestal de Cedrela Lilloi C.DC. LEONCIO PRADO* [online]. Universidad Nacional del Centro del Perú, 2016. Available from: <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1850/TesisReyes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
30. RIVERA, Lesly. *Efecto de la aplicación del Glifosato en la microfauna del suelo de cultivo de café (coffea arabica) variedad Catimor en San Ignacio- Cajamarca, 2017-2018*. Universidad Cesar Vallejo, 2018.
31. ARÉVALO, Enrique, CAYOTOPA, José, OLIVERA, Delmar, GÁRATE, Mar, TRIGOSO, Erick, COSTA, Bomfim and LEON, Betsabe. Optimización de sustratos para la producción de conidias de Trichoderma harzianum. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Journal of High Andean Reaearch* [online]. 2017. Vol. 19, no. 2, p. 135–144. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/ria/v19n2/a03v19n2.pdf>
32. MENDOZA, Gicelly A T, WILSON, Juan H and COLINA, Juan C. Efecto de Trichoderma atroviride , Trichoderma harzianum y Trichoderma viride sobre huevos de Meloidogyne sp . en condiciones de laboratorio effect on Meloidogyne sp . eggs under laboratory conditions. . 2013. Vol. 1, no. 2, p. 65–71.
33. PUGA, Cynthia. *Efecto del herbicida glifosato sobre la germinación, crecimiento y la capacidad antogina de especies nativas de Thichoderma Harzianum en condiciones de laboratorio*. Universidad Nacional de Trujillo, 2016.
34. ARRÁZOLA VÁSQUEZ, Elsa María. ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL Laboratorio de Contaminación de Suelos Tesis para optar al Título Profesional de : Ingeniero Ambiental Bach . ELSA MARÍA ARRÁZOLA VÁSQUEZ Lima , Perú. . 2016.
35. ALTOANDINAS, Revista De Investigaciones, TRICHODERMA, Cepas De, TTACCA, Betsabe Leon, CALCINA, Nora Ortiz, TICONA, Norma Condori and YUPANQUI, Ernesto Chura. Cepas de Trichoderma con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua. *Rev. Investig. Altoandina*. 2018. Vol. 20, no. 1, p. 19–30.
36. IANNACONE, José. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera : Gelechiidae), en el Perú. . 2003. No. January.
37. INFO@AGROBETA.COM. MICROORGANISMOS DEL SUELO BENEFICIOSOS PARA LOS CULTIVOS. [online]. 2012. Available from: <https://www.agrobeta.com/agrobetablog/2012/08/microorganismos-del-suelo-beneficiosos-para-los-cultivos/#.XbyvjfVKjIU>

38. BOLETIN ERP. Aprovechamiento de hongos bondadosos en agricultura: Trichoderma - Software ERP Agrícola: Gestión integral de Ranchos Agrícolas. . 2016.
39. EZZIYYANI, Mohammed, PÉREZ SÁNCHEZ, Consuelo, SID AHMED, Ahmed, EMILIA REQUENA, María and EMILIA CANDELA, María. *Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimienta (Capsicum annuum L.)*. 2004.
40. SIVILA, Nancy and ALVAREZ, Susana. *PRODUCCION ARTESANAL DE TRICHODERMA*. Argentina, 2013. ISBN 978-950-721-443-1.
41. CERVANTES FLORES, Miguel Ángel. Microorganismos del suelo beneficiosos para los cultivos. . 2015.
42. ALEXOPOULOS, Constantine John, MIMS, Charles W. and BLACKWELL, Meredith. *Introductory mycology*. 4a edición. Wiley India Pvt. Ltd, 2014. ISBN 8126511087.
43. TRICHODEX. La aplicación del hongo Trichoderma Harzianum | TRICHODEX. .
44. TOVAR CASTAÑO, JULIO CÉSAR. *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA "in vivo" DE AISLAMIENTOS DE Trichoderma spp FRENTE AL HONGO FITOPATOGENO Rhizoctonia solani* JULIO CÉSAR TOVAR CASTAÑO PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS CARRERA DE MICROBIOLOGÍA AGRICOLA. Bogotá DC, 2008.
45. BENÍTEZ, Tahia, RINCÓN, Ana M, LIMÓN, M Carmen and CODÓN, Antonio C. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. December 2004. Vol. 7, no. 4, p. 249–60.
46. AGROTERRA. Herbicidas, clasificación y uso | Agrotterra Blog. . 2018.
47. AGROTERRA. Herbicidas, clasificación y uso | Agrotterra Blog. . 2015.
48. NEOAGRUM, S A C. *Ficha técnica - GLIFOSATO (FUEGO)*. Perú, 2016.
49. RILEY PETE, COTTER JANET, CONTIERO MARCO, Watts Meriel. Tolerancia a Herbicidas y Cultivos Transgénicos. *Greenpeace* [online]. 2011. P. 1–58. Available from: <http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2011/bosques/informe-glifosato-español-v2.pdf> El glifosato es el ingrediente activo en muchos herbicidas comercializados en todo el mundo, incluyendo la conocida formulación Roundup. .
50. ADELBERG, Melnick, BROOKS, Geo F, CARROLL, Karen C, OF PATHOLOGY, Professor, BUTEL, Janet S, MORSE, Stephen A, TIMOTHY MIETZNER, Atlanta A, PROFESSOR, Associate and RAFAEL BLENGIO PINTO JOSÉ LUIS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ ANA MARÍA PÉREZ TAMAYO RUIZ GERMÁN ARIAS REBATET, José. *A LANGE medical book* [online]. 2011. [Accessed 18 May 2019]. ISBN 9786071505033. Available from: http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smffyc.com.pdf
51. *PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO* [online]. [no date]. [Accessed 11 June 2019]. Available from: [https://www.ugr.es/~cjl/medios de cultivo.pdf](https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf)
52. Los medios de cultivo en microbiología. [online]. [Accessed 19 May 2019]. Available from: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioMedios.htm>
53. ¿Para qué sirve un agar microbiología? [online]. [Accessed 12 June 2019]. Available from: <https://mdmcientifica.com/agar-microbiologia/>

54. INSUMOLAB. *Agar Papa Dextrosa* [online]. Santiago, [no date]. Available from: https://www.insumolab.cl/descargas/industria/placas_90mm/ficha_tecnica/02.pdf
55. *Sabouraud Glucosado Agar* [online]. [no date]. [Accessed 27 June 2019]. Available from: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2971216486e.pdf
56. *Medición del crecimiento Microbiano* [online]. [no date]. [Accessed 15 June 2019]. Available from: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf
57. ACEVEDO, Rosa, SEVERICHE, Carlos and CASTILLO, Marlon. *Biología y Micobiología Ambiental* [online]. Colombia, 2013. [Accessed 15 June 2019]. Available from: <http://www.eumed.net/libros-gratis/ciencia/2013/22/22.pdf>
58. CARRILO, Leonor. Glosario. In : *Manual de Microbiología Agrícola*. 2013. p. 14. ISBN 978-950-721-465-3.
59. Una aplicación: Introducción al Bioensayo. [online]. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <http://www.ub.edu/stat/GrupsInnovacio/Statmedia/demo/Temas/Capitulo13/B0C13m1t10.htm>
60. REAL ACADEMIA DE INGENIERÍA. concentración iónica | Real Academia de Ingeniería. .
61. D GENERAL. Degradación - Qué es y Definición. [online]. 2019. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <https://conceptodefinicion.de/degradacion/>
62. CONTRERAS, Ramón. Enterobacterias | La guía de Biología. [online]. 2013. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/enterobacterias>
63. ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FABRICANTES DE AGRONUTRIENTES. Fertilizante. [online]. 2017. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <https://aefa-agronutrientes.org/glosario-de-terminos-utiles-en-agronutricion/fertilizante>
64. GREENPEACE ESPAÑA. Glifosato. [online]. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/agricultura/glifosato/>
65. INFOJARDIN. Glosario de jardinería, flores, plantas y medio ambiente definición diccionario. [online]. [Accessed 2 October 2018]. Available from: <http://www.infojardin.net/glosario/d-flores-plantas-jardin.htm>
66. MUCILAGINOSA - Definición y sinónimos de mucilaginosa en el diccionario español. .
67. PÉREZ, Julián and GARDEY, Ana. Definición de parcela - Qué es, Significado y Concepto. [online]. 2013. [Accessed 20 June 2019]. Available from: <https://definicion.de/parcela/>
68. *OSMOSIS Y PRESIÓN OSMÓTICA*. [no date].
69. INTAGRI. ¿Sistema Radical o Sistema Radicular? | Intagri S.C. . 2017.
70. ROMERO CABALLERO, Alejandro. Metodología de la investigación científica. In : *Metodología de la investigación científica*. 1a edición. Lima, 2000. p. 296. ISBN 9972922618.
71. HERNÁNDEZ, Roberto, FERNÁNDEZ, Carlos and BAPTISTA, María. *Metodología de la Investigación 6a edición*. 6a edición. Mexico, 2016. ISBN 978-1-4562-2396-0.

72. HILDA, Ing, RAMÍREZ, Gómez, ENRIQUE, Blg and DEL, Torres. *Manual De Producción Y Uso De Hongos Antagonistas*. Perú, 2013. 2013 “Decenio de las Personas con Discapacidad en el Perú” “Año de la Integración Nacional y el Reconocimiento de Nuestra Diversidad” LABORATORIO DE ANTAGONISTAS SCB-SENASA 2
CONTENIDO
73. SAMANIEGO. CAMARA DE NEUBAUER. [online]. 2015. Available from:
<http://profesamaniego.blogspot.com/2015/03/formula-de-la-camara-de-neubauer.html>
74. CHIRIBOGA, Graciela, GÓMEZ B, Karla and GARCÉS E, Hernán. *PROTOCOLOS PARA FORMULACIÓN Y APLICACIÓN DEL BIO-INSUMO: Trichoderma spp. para el control biologico de enfermedades*. [no date].
75. AGRO, Libros del. *Trichoderma harzianum, un poderoso fungicida biológico*. [online]. 2019. Available from: <http://librosdelagro.blogspot.com/2019/07/trichoderma-harzianum-un-poderoso.html>

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de Consistencia.

“INFLUENCIA DEL GLIFOSATO EN EL HONGO *TRICHODERMA HARZIANUM* PROVENIENTE DE RHIZOCTONIA SOLANIA DEL CULTIVO DE ALGODÓN, HUANCAYO 2019”

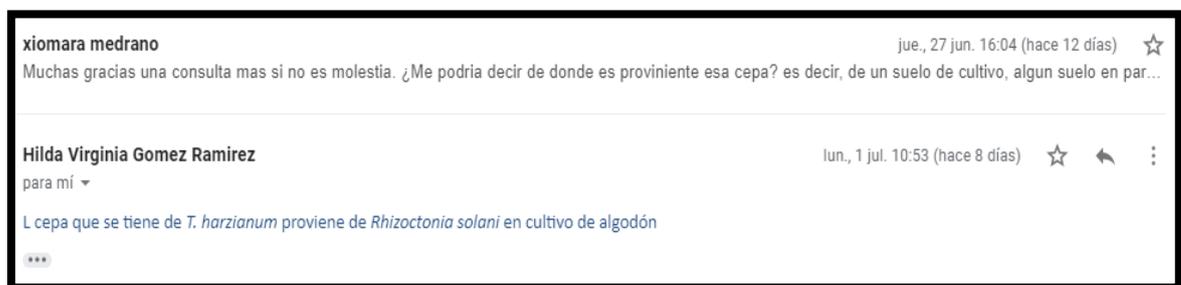
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLOGIA
<p>General</p> <p>¿Cuál es la influencia del glifosato en la reproducción de <i>Trichoderma harzianum</i> a nivel de laboratorio?</p>	<p>General</p> <p>Determinar qué tipo de influencia tiene el glifosato en la reproducción de <i>Trichoderma harzianum</i> a nivel de laboratorio.</p>	<p>General</p> <p>El glifosato influye en la reproducción de <i>Trichoderma harzianum</i> debido a que disminuye sus propágulos mediante conidias.</p>	<p>Independiente:</p> <p>glifosato.</p>	<p>Dosis usada en campo.</p>	<p>0,50 ml 0,75 ml 1 ml 1,25 ml 1,50 ml</p>	<p>General</p> <p>Inductivo y cuantitativo.</p> <p>Específicos</p> <p>Experimental.</p>
<p>Específico</p> <p>¿Cuál de las concentraciones de glifosato influye en el número de conidias de <i>Trichoderma harzianum</i>?</p>	<p>Específico</p> <p>Describir cuál de las concentraciones de glifosato influye en el número de conidias de <i>Trichoderma harzianum</i>.</p>	<p>Específico</p> <p>Las concentraciones de 1.25 ml y 1.50 ml de glifosato disminuyen significativamente el número de conidias del hongo <i>Thichoderma harzianum</i>.</p>	<p>Dependiente:</p> <p>Hongo <i>Trichoderma harzianum</i></p>	<p>Reproducción del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> proveniente de <i>R.solania</i> del cultivo de algodón.</p>	<p>Número de conidias.</p>	

Anexo 2: Operacionalización de las variables.

VARIABLES	TIPO DE VARIABLES	DEFINICIÓN	CATEGORÍAS O DIMENSIONES	INDICADORES
(X) <u>INDEPENDIENTE</u> GLIFOSATO	Naturaleza	El glifosato es un herbicida muy utilizado que es utilizado para eliminar hierbas y arbustos que han crecido en un tiempo y espacio deseado(4).	0.50 ml 0.75 ml 1 ml 1.25 ml 1.50 ml	ml
	Cuantitativa			
	Función			
	Independiente			
(Y) <u>DEPENDIENTE</u> <i>Trichoderma harzianum</i>	Naturaleza	Es un microorganismo que se encuentra presente en casi todo tipo de suelo, debido a que son hongos cultivables que más prevalecen una gran cantidad de este género de hongos se caracterizan por ser simbióticos.	<i>Trichoderma harzianum</i>	Conteo de conidias
	Cuantitativa			
	Función			
	Dependiente			

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 3: Respuesta de la responsable con respecto a la procedencia del hongo T.h.



Fuente: Elaboración propia.

Anexo 4: Compra de la cepa – SENASA.

COMPRA DE CONTROLADOR BIOLÓGICO

PRODUCTO: SEPA de *Trichoderma harzianum*

COMPRADOR: MEDRANO DE LA TORRE ELSA XIOMARA
DNI 70041404
DIRECCION CALLE REAL 297, Distrito Chilca, Provincia Huancayo, Región Junín
TELEFONO 958469996
CORREO ELECTRONICO xiomy.delatorre@gmail.com
PAGO 131.76 SOLES

 Banco de la Nación

S/R.: 0308 CHILCA-HUANCAYO
RUC : 20100030595

RP: 0308455
03/07/2019

DEPOSITO EN EFECTIVO CTA. CTE. MN
F.P.:03/07/2019

CUENTA DESTINO : 00-000-282499
DENOMINACION : SENASA RDR D.S.195-2001-EF
NRO. DOCUMENTO : RUC 020131373075
ORDENANTE : MEDRANO DE LA TORRE ELSA XIOMARA
NRO. DOCUMENTO : 70041404
IMPORTE : S/ *****131.76
PAGO COMISION : S/ *****00
ITF COMISION : S/ *****00
ITF C/CTA. : S/ *****00



EJECUTANTE :
MEDRANO DE LA TORRE ELSA XIOMARA

DNI 0035090 0700 70041404 0308 15:15

00348855 -5-0> Banco de la Nación CLIENTE Banco de la Nación

NOTA:

El producto entregar a Ing. Willy Soberanis para que lo envíe por otro medio.

Anexo 7: Datos

❖ Conteo en la cámara de Neubauer.

Muestra control											
1°	C1	C2	2°	C1	C2	3°	C1	C2	4°	C1	C2
	9	6		9	6		8	6		3	7
	6	7		6	7		6	7		4	5
	5	10		5	10		5	10		5	9
	6	8		6	8		6	6		12	8
	4	14		8	14		4	14		6	10
Promedio	37.5		Promedio	39.5		Promedio	36		Promedio	34.5	
5°	C1	C2	6°	C1	C2	7°	C1	C2	8°	C1	C2
	10	9		4	10		5	2		6	9
	6	7		8	17		3	6		6	7
	5	8		9	4		18	5		9	2
	4	8		6	8		9	10		7	10
	4	13		7	6		5	9		5	8
Promedio	37		Promedio	39.5		Promedio	36		Promedio	34.5	
9°	C1	C2	10°	C1	C2	11°	C1	C2			
	5	8		14	6		10	8			
	6	7		8	7		3	10			
	5	10		5	4		7	9			
	2	9		10	9		6	8			
	6	11		4	8		5	6			
Promedio	34.5		Promedio	37.5		Promedio	36				

Dosis de 0.50 ml											
1°	C1	C2	2°	C1	C2	3°	C1	C2	4°	C1	C2
	5	2		2	7		4	6		4	7
	4	4		4	8		7	8		5	3
	1	10		6	6		5	6		8	6
	6	8		6	6		3	3		6	4
	8	3		4	6		4	6		5	5
Promedio	25.5		Promedio	27.5		Promedio	26		Promedio	26.5	
5°	C1	C2	6°	C1	C2	7°	C1	C2	8°	C1	C2
	5	8		4	7		3	5		4	4
	4	8		5	7		5	4		7	5
	6	7		4	4		6	3		5	6
	5	4		7	4		12	3		4	6
	4	4		6	3		5	5		6	6
Promedio	27.5		Promedio	25.5		Promedio	25.5		Promedio	26.5	
9°	C1	C2	10°	C1	C2	11°	C1	C2			

3	5				
4	4				
8	7				
7	5				
6	3				
Promedio	26	Promedio	27.5	Promedio	25

Dosis 0.75 ml

1°	C1	C2	2°	C1	C2	3°	C1	C2	4°	C1	C2
7	2		4	6		3	5		6	4	
4	6		2	1		4	5		5	3	
5	2		2	5		7	6		6	3	
4	4		7	6		3	5		4	5	
6	4		5	3		4	7		3	3	
Promedio	22		Promedio	20.5		Promedio	24.5		Promedio	21	
5°	C1	C2	6°	C1	C2	7°	C1	C2	8°	C1	C2
6	8		4	3		3	8		2	5	
3	5		4	5		3	4		2	4	
4	3		6	4		5	4		5	8	
4	5		4	4		4	3		4	1	
4	7		6	4		3	4		6	5	
Promedio	24.5		Promedio	22		Promedio	20.5		Promedio	21	
9°	C1	C2	10°	C1	C2	11°	C1	C2			
3	4		5	3		6	3				
3	3		3	4		4	5				
4	5		6	5		5	4				
4	5		4	3		5	2				
3	7		4	6		4	3				
Promedio	20.5		Promedio	21.5		Promedio	20.5				

Dosis 1 ml

1°	C1	C2	2°	C1	C2	3°	C1	C2	4°	C1	C2
4	2		5	4		1	6		9	3	
2	6		4	4		3	8		5	3	
2	3		3	3		4	5		1	2	
2	3		5	4		4	3		3	4	
4	3		3	3		2	2		1	2	
Promedio	15.5		Promedio	19		Promedio	19		Promedio	16.5	
5°	C1	C2	6°	C1	C2	7°	C1	C2	8°	C1	C2
4	5		2	1		3	2		3	3	
2	5		3	3		5	2		2	6	
2	3		5	5		4	0		1	5	
3	4		4	4		4	3		2	4	
2	3		5	2		5	4		1	5	

Promedio	16.5	Promedio	17	Promedio	16	Promedio	16
9°	C1 C2	10°	C1 C2	11°	C1 C2		
	4 3		5 4		8 2		
	4 2		1 3		1 3		
	2 2		3 3		7 2		
	2 4		2 5		2 4		
	3 4		4 5		3 1		
Promedio	15	Promedio	17.5	Promedio	16.5		

Dosis 1.25 ml

1°	C1 C2	2°	C1 C2	3°	C1 C2	4°	C1 C2
	4 2		3 2		1 3		1 3
	3 2		4 2		4 3		1 5
	0 4		3 1		2 3		1 4
	2 1		3 0		2 2		3 3
	3 3		1 1		2 5		2 4
Promedio	12	Promedio	10	Promedio	13.5	Promedio	13.5
5°	C1 C2	6°	C1 C2	7°	C1 C2	8°	C1 C2
	3 4		2 3		1 3		2 2
	2 3		5 2		4 2		1 3
	2 1		3 2		3 3		6 4
	2 3		3 2		3 0		2 1
	4 2		1 3		3 5		1 1
Promedio	13	Promedio	13	Promedio	13.5	Promedio	11.5
9°	C1 C2	10°	C1 C2	11°	C1 C2		
	1 2		3 2		3 4		
	5 3		1 2		2 2		
	3 1		5 1		1 1		
	3 3		4 3		3 3		
	2 4		2 4		3 2		
Promedio	13.5	Promedio	13.5	Promedio	12		

Dosis 1.50 ml

1°	C1 C2	2°	C1 C2	3°	C1 C2	4°	C1 C2
	3 1		0 1		2 1		2 0
	0 3		0 2		0 1		0 2
	3 2		2 2		2 0		2 2
	1 0		0 0		2 4		1 2
	1 2		2 1		0 1		1 3
Promedio	8	Promedio	5	Promedio	6.5	Promedio	7.5
5°	C1 C2	6°	C1 C2	7°	C1 C2	8°	C1 C2
	2 1		1 1		1 3		1 1
	1 1		1 1		1 2		4 0
	1 1		2 1		3 0		1 3

	0	2		1	1		3	1		0	3
	1	2		2	1		1	1		1	0
Promedio	6		Promedio	6		Promedio	8		Promedio	7	
9°	C1	C2	10°	C1	C2	11°	C1	C2			
	4	0		0	2		0	4			
	2	4		2	2		1	0			
	1	2		1	0		0	1			
	1	2		3	2		1	3			
	0	0		0	2		1	1			
Promedio	8		Promedio	7		Promedio	6				

Anexo 8: Procesamiento de los datos.

- ❖ La dilución es de 10^2
- ❖ N° de conidias/ ml

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{conidias}}{\text{ml}} = \text{Promedio de } N^{\circ} \text{ conidias} \times 5 \times 10^4 \times \text{Inv. dilución.}$$

- ❖ N° de conidias totales

El volumen de la suspensión original de la conidias es 10 ml

$$N^{\circ} \text{ de conidias totales} = N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{conidias}}{\text{ml}} \times \text{Vol. de la suspensión original.}$$

- ✓ Muestra control

$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 37.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18.75 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.75 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.75 \times 10^8$	$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 39.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 19.75 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 19.75 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 19.75 \times 10^8$
$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 36 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^8$	$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 34.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 17.25 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^8$
$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 37 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18.5 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.5 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.5 \times 10^8$	$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 39.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 19.75 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 19.75 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 19.75 \times 10^8$
$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 36 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^8$	$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 34.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 17.25 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^8$
$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 34.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 17.25 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 17.25 \times 10^8$	$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 37.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18.75 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.75 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18.75 \times 10^8$
$N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 36 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^{\circ} \text{ de conidias/ml} = 18 \times 10^7$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^7 \times 10$ $N^{\circ} \text{ de conidias totales} = 18 \times 10^8$	

$N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^8$	$N^\circ \text{ de conidias totales} = 2.5 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 2.5 \times 10^8$
$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 6.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3.25 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.25 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.25 \times 10^8$	$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 7.5 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3.75 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.75 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.75 \times 10^8$
$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 6 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^8$	$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 6 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^8$
$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 8 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 4 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^8$	$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 7 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3.5 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.5 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.5 \times 10^8$
$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 8 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 4 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 4 \times 10^8$	$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 7 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3.5 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.5 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3.5 \times 10^8$
$N^\circ \text{ de conidias/ml} = 6 \times 5 \times 10^4 \times 10^2$ $N^\circ \text{ de conidias/ml} = 3 \times 10^7$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^7 \times 10$ $N^\circ \text{ de conidias totales} = 3 \times 10^8$	

Anexo 9: Tabla resumen del conteo de conidias en la Cámara de Neubauer.

Tabla 4: Promedio de conidias contadas en Cámara de Neubauer.

Promedio del conteo en cámara de Neubauer.					
Control	Dosis				
	0.50 ml	0.75 ml	1 ml	1.25 ml	1.50 ml
37.5	25.5	22	15.5	12	8
39.5	27.5	20.5	19	10	5
36	26	24.5	19	13.5	6.5
34.5	26.5	21	16.5	13.5	7.5
37	27.5	24.5	16.5	13	6
39.5	25.5	22	17	13	6
36	25.5	20.5	16	13.5	8
34.5	26.5	21	16	11.5	7
34.5	26	20.5	15	13.5	8
37.5	27.5	21.5	17.5	13.5	7
36	25	20.5	16.5	12	6

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 10: Tabla del conteo de conidias/ ml

Tabla 5: Resultados del conteo del N° de conidias/ml $\times 10^{-2}$

N° de conidias/ ml (control)	DOSIS				
	0.50 ml	0.75 ml	1 ml	1.25 ml	1.50 ml
	N° de conidias/ml				
187500000	127500000	110000000	77500000	60000000	40000000
197500000	137500000	102500000	95000000	50000000	25000000
180000000	130000000	122500000	95000000	67500000	32500000
172500000	132500000	105000000	82500000	67500000	37500000
185000000	137500000	122500000	82500000	65000000	30000000
197500000	127500000	110000000	85000000	65000000	30000000
180000000	127500000	102500000	80000000	67500000	40000000
172500000	132500000	105000000	80000000	57500000	35000000
172500000	130000000	102500000	75000000	67500000	40000000
187500000	137500000	107500000	87500000	67500000	35000000
180000000	125000000	102500000	82500000	60000000	30000000

Fuente: Elaboración propia

Anexo 11: Tabla del conteo de conidias totales

Tabla 6: Resultado del conteo del N° de conidias totales

N° de conidias totales (control)	Dosis				
	0.50 ml	0.75 ml	1 ml	1.25 ml	1.50 ml
	N° de conidias totales				
1875000000	1275000000	1100000000	775000000	600000000	400000000
1975000000	1375000000	1025000000	950000000	500000000	250000000
1800000000	1300000000	1225000000	950000000	675000000	325000000
1725000000	1325000000	1050000000	825000000	675000000	375000000
1850000000	1375000000	1225000000	825000000	650000000	300000000
1975000000	1275000000	1100000000	850000000	650000000	300000000
1800000000	1275000000	1025000000	800000000	675000000	400000000
1725000000	1325000000	1050000000	800000000	575000000	350000000
1725000000	1300000000	1025000000	750000000	675000000	400000000
1875000000	1375000000	1075000000	875000000	675000000	350000000
1800000000	1250000000	1025000000	825000000	600000000	300000000

Fuente: Elaboración propia.

Anexo 12: Evidencia fotográfica.

Incubación de las placas sembradas.



Fuente: Elaboración propia.

Revisión de las placas.



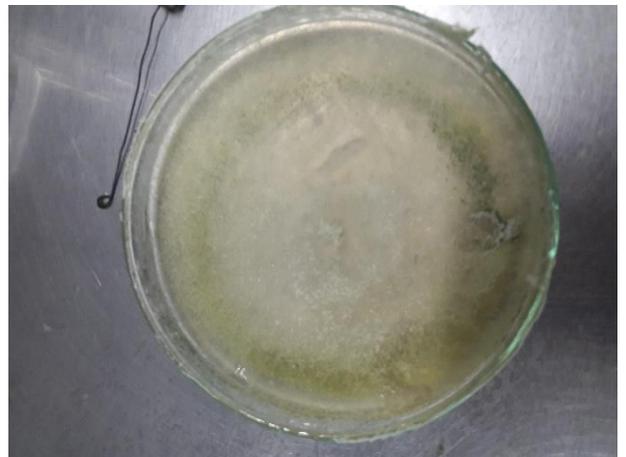
Fuente: Elaboración propia.

Muestra control.



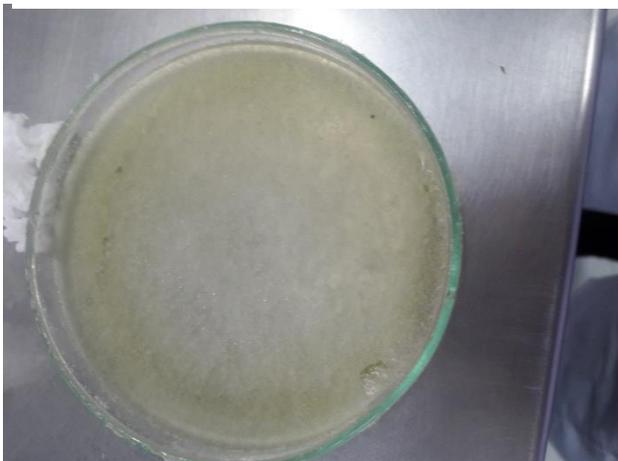
Fuente: Elaboración propia.

Placa con 0.50 ml de glifosato.



Fuente: Elaboración propia.

Placa con 0.75 ml de glifosato.



Fuente: Elaboración propia.

Placa con 1 ml de glifosato.



Fuente: Elaboración propia.

Placa con 1.25 ml de glifosato.



Fuente: Elaboración propia.

Placa con 1.50 ml de glifosato.



Fuente: Elaboración propia.

Uso del vórtex por 1 minuto por cada dilución.



Fuente: Elaboración propia.

Tubos con cada dilución.



Fuente: Elaboración propia.

Conteo con la cámara de Neubauer



Fuente: Elaboración propia.

Preparación del medio de cultivo



Fuente: Elaboración propia.



Universidad
Continental

CONSTANCIA

El que suscribe jefe de laboratorio de ciencias básicas ing. Torres Cáceres Carmen Rosa

Hace constatar que la Srta. Medrano De La Torre Elsa Xiomara, identificado con el DNI 70041404, hizo uso de las instalaciones y recursos del laboratorio de microbiología para el desarrollo de la tesis de investigación “**INFLUENCIA DEL GLIFOSATO EN EL HONGO *TRICHODERMA HARZIANUM* PROVENIENTE DE LA RHIZOCTONIA SOLANIA EN CULTIVO DE ALGODÓN, HUANCAYO 2019**”, cuyo trabajo en laboratorio inicio el día 22 de agosto del 2019 y culmino el día 17 de septiembre del 2019. Habiendo hecho uso de los equipos y materiales con responsabilidad y eficiencia.

Por lo tanto, se expide la presente constancia que acredita el uso de los laboratorios de microbiología de la Universidad Continental.

Huancayo, 27 de setiembre del 2019




Carmen Torres Cáceres
Jefatura de Laboratorios de
Ciencias Básicas
Universidad Continental

Ing. Torres Cáceres Carmen Rosa
Jefa de Laboratorio de Ciencias Básicas

Lima
Jr. Junin 355, Miraflores
(01) 213 2760

Arequipa
Calle Alfonso Ugarte 607 - Yanahuara
(54) 412 030

Huancayo
Av. San Carlos 1980
(64) 481 430

Cusco
Urb. Manuel Prado B-13
(84) 480 070