



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

## **FACULTAD DE INGENIERÍAS EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

### **CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE HERBICIDAS EN LA POBLACIÓN DE  
BACTERIAS PRESENTES EN UN BIOFERTILIZANTE APLICADO AL MAÍZ DE  
ALTURA, CUTUGLAGUA, PICHINCHA.**

**Trabajo de grado previa a la obtención del Título de Ingeniera en Agropecuaria**

**AUTORA:**

**Tobar Andrade Carla Yadira**

**DIRECTORA:**

**Ima Sánchez, MSc.**

**Ibarra, 2021**

ESCUELA DE INGENIERÍA EN AGROPECUARIA

**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE HERBICIDAS EN LA POBLACIÓN DE  
BACTERIAS PRESENTES EN UN BIOFERTILIZANTE APLICADO AL MAÍZ DE  
ALTURA, CUTUGLAGUA, PICHINCHA”**

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como  
requisito parcial para obtener Título de:  
**INGENIERA AGROPECUARIA**

APROBADO:

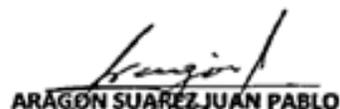
Lic. Ima Sánchez, MSc.  
**DIRECTOR**



---

FIRMA

Ing. Juan Pablo Aragón, MSc.  
**MIEMBRO TRIBUNAL**



ARAGÓN SUÁREZ JUAN PABLO

Ing. Franklin Sánchez, MSc.  
**MIEMBRO TRIBUNAL**



---

FIRMA



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100375725-7		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Tobar Andrade Carla Yadira		
DIRECCIÓN:	Manabí 2-406 Isla Santa Cruz		
EMAIL:	cytobara@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	062-514-415	TELÉFONO MÓVIL:	0982879334

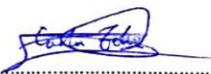
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE HERBICIDAS EN LA POBLACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN UN BIOFERTILIZANTE APLICADO AL MAÍZ DE ALTURA, CUTUGLAGUA, PICHINCHA
AUTOR (ES):	Carla Yadira Tobar Andrade
FECHA: DD/MM/AAAA	09/04/2021
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniería Agropecuaria
ASESOR /DIRECTOR:	Lic. Ima Sánchez, MSc.

#### 2. CONSTANCIAS

El autor (es) manifiesta (n) que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es original y que es (son) el (los) titular (es) de los derechos patrimoniales, por lo que asume (n) la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 09 días del mes de abril de 2021

EL AUTOR:

  
.....  
Carla Yadira Tobar Andrade

## **CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Carla Yadira Tobar Andrade, bajo mi supervisión.

Ibarra, a los 09 días del mes de abril de 2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'I. Sumac', written over a horizontal line.

Lic. Ima Sumac Sánchez de Céspedes, MSc.  
DIRECTOR DE TESIS

## REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

**Guía:** FICAYA-UTN

**Fecha:** Ibarra, a los 09 días del mes de abril del 2021

**Carla Yadira Tobar Andrade:** "EFECTO DE LA APLICACIÓN DE HERBICIDAS EN LA POBLACION DE BACTERIAS PRESENTES EN UN BIOFERTILIZANTE APLICADO AL MAÍZ DE ALTURA, CUTUGLAGUA, PICHINCHA" /Trabajo de titulación. Ingeniera Agropecuaria.

Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Ibarra, a los 09 días del mes de abril del 2021, 82 páginas.

**DIRECTOR (A):** Lic. Ima Sumac Sánchez de Céspedes, MSc.

El objetivo principal de la presente investigación fue:

Evaluar el efecto de herbicidas en la población de bacterias presentes en un biofertilizante aplicado al maíz de altura.

Entre los objetivos específicos se encuentran:

1. Determinar el efecto de la aplicación de herbicidas sobre el crecimiento *in-vitro* de *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* NI5.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de herbicidas sobre la población de *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* NI5 en el cultivo de maíz bajo invernadero.



Lic. Ima Sumac Sánchez de Céspedes, MSc.

Directora de Trabajo de Grado



Carla Yadira Tobar Andrade

Autora

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica del Norte y la Facultad de Ingenierías en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, a todas sus autoridades y personal docente que a lo largo de mi carrera fueron comprometidos en mi formación académica profesional; por haberme brindado la oportunidad de culminar mis estudios de pregrado dentro de su prestigiosa casa de estudios.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), al Dr. José Luis Zambrano, responsable del Programa de Maíz, al Ing. Carlos Sangoquiza técnico de KOPIA, por haber facilitado sus conocimientos, experiencias técnicas y valioso aporte científico necesarios para la realización del presente estudio.

A la Lic. Ima Sánchez, M.Sc., directora de tesis; y a los ingenieros Juan Pablo Aragón y Franklin Sánchez, por su apoyo y enseñanza durante este trabajo de investigación y por hacer posible la culminación del estudio.

A mis padres y hermanos quienes día a día me motivaron para seguir adelante y apoyaron en todas las formas posibles para conseguir esta gran meta.

Un agradecimiento especial a Cris, Mary, Mariela, Marcelo, Carlos y José Luis, por su amistad, consejos, risas y momentos inolvidables que hicieron más grato y alegre mi estadía en el INIAP, durante el proceso de la tesis.

A mis amigas Saida, Sole y Susy por estar a lo largo de mi formación, les agradezco por su desinteresada ayuda, por los buenos momentos en los que convivimos, por esas aventuras inolvidables que hicieron que la vida en las aulas sea más divertida y alegres.

A toda la gente que me brindó su apoyo y que hizo posible la realización de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Rosa Andrade por ser el pilar fundamental en mi vida por enseñarme a valorar el esfuerzo propio, por su apoyo y amor incondicional durante toda mi formación académica y personal, a quien admiro por su tenacidad y constancia para encarar a los problemas sin desfallecer en el intento, quien es fuente de inspiración para alcanzar mis anhelos.

A mi padre José Tobar quien estuvo a mi lado brindándome sus experiencias, por haberme forjado como ser humano, quien imprimió en mi ese fuerte deseo de superación y ser constante para alcanzar mis metas.

A mis hermanos Andres, Miguel, Nataly, Carlos y Edison, a quienes quiero y admiro mucho, son mis mejores amigos, mis consejeros, mi motivación por compartir momentos inolvidables y vivir experiencias únicas que nos unen como familia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	v
RESUMEN .....	vi
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Problema de investigación .....	3
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos .....	6
1.4.1 Objetivo general .....	6
1.4.2 Objetivos específicos .....	6
1.5 Hipótesis.....	6
.CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 Origen e importancia del maíz <i>Zea mays</i> L.....	7
2.2 Manejo del cultivo de maíz .....	7
2.3 Control de malezas mediante herbicidas.....	8
2.3.1 Clasificación de herbicidas según el modo de acción .....	8
2.3.2 Efectos del uso de herbicidas.....	11
2.4 Alternativas de manejo de cultivos .....	12
2.5 Biofertilizantes .....	12
2.5.1 Bacterias del género <i>Azospirillum</i> .....	13
2.5.2 Bacterias del género <i>Pseudomonas</i> .....	13
2.6 Marco legal.....	14
CAPÍTULO III.....	16
MARCO METODOLÓGICO.....	16
3.1 Descripción del área de estudio.....	16
3.2 Material experimental .....	16

3.3 Métodos.....	17
3.3.1 Experimento 1 ( <i>in-vitro</i> ).....	17
3.3.2. Experimento 2 (Plantas de maíz).....	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1 Experimento I: <i>In vitro</i> .....	33
4.2 Experimento II: Plantas de maíz bajo invernadero .....	37
4.2.1 Colonización de bacterias.....	38
4.2.2 Longitud de raíz.....	42
4.2.3 Peso seco de raíz.....	45
4.2.4 Materia seca foliar .....	47
CAPÍTULO V.....	51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	51
5.1 Conclusiones .....	51
5.2 Recomendaciones .....	52
6. BIBLIOGRAFÍA .....	53
7. ANEXOS .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de los tratamientos <i>in vitro</i> - (DCA) .....	18
Figura 2: Conteo de colonias .....	20
Figura 3: Concentración bacteriana .....	21
Figura 4: Medio de cultivo King B .....	21
Figura 5: Dilución y siembra de cepas.....	22
Figura 6: Distribución de los tratamientos en invernadero (DBCA). .....	23
Figura 7: Toma de muestras.....	25
Figura 8: Siembra de cepas .....	25
Figura 9: Siembra de cepas .....	26
Figura 10: Longitud radical .....	26
Figura 11: Peso seco de raíz.....	27
Figura 12: Peso foliar .....	27
Figura 13: Elaboración del biofertilizante .....	29
Figura 14: Mezcla del sustrato .....	29
Figura 15: Desinfección de la semilla.....	30
Figura 16: Inoculación de semilla con el biofertilizante.....	30
Figura 17: Manejo del cultivo.....	31
Figura 18: Uso de herbicida.....	31
Figura 19: Riego de plantas .....	31
Figura 20: Solución Steiner .....	32
Figura 21: Plantas a las que se hizo el monitoreo en busca de plagas.....	32
Figura 22: Crecimiento poblacional de <i>Azospirillum</i> sp. <i>in vitro</i> .....	34
Figura 23: Crecimiento poblacional de <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>in vitro</i> ... ..	36

Figura 24: Colonización radicular de la cepa <i>Azospirillum</i> sp. en planta de maíz: .....	39
Figura 25: Colonización radicular de la cepa <i>Pseudomonas fluorescens</i> . en planta de maíz. .....	41
Figura 26: Longitud radicular de acuerdo al tipo de desinfección.....	43
Figura 27: Longitud radicular de acuerdo al tipo de herbicida.....	44
Figura 28: Peso Seco de raíz.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características del área de estudio .....	16
Tabla 2: Parámetros climáticos del invernadero .....	16
Tabla 3: Materiales del experimento.....	16
Tabla 4: Cepas de bacterias.....	17
Tabla 5: Concentración de los herbicidas .....	17
Tabla 6: Tratamientos a evaluarse .....	18
Tabla 7: Esquema de la ADEVA en diseño completamente al azar para <i>Azospirillum</i> sp. y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	19
Tabla 8: Tratamiento de desinfección de la semilla.....	22
Tabla 9: Concentración de los herbicidas .....	22
Tabla 10: Tratamientos a evaluarse .....	23
Tabla 11: Esquema del ADEVA en Diseño Completamente al Azar.....	24
Tabla 12: ADEVA del Efecto de herbicidas sobre el crecimiento poblacional de <i>Azospirillum</i> sp. ....	33
Tabla 13: ADEVA del efecto de herbicidas sobre el crecimiento poblacional de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	35
Tabla 14: Análisis de varianza para población de <i>Azospirillum</i> sp. presentes en la rizósfera de maíz variedad INIAP-101 .....	38
Tabla 15: Análisis de varianza para población de <i>Pseudomonas fluorescens</i> presentes en la rizósfera de maíz variedad INIAP-101 .....	40
Tabla 16: Análisis de varianza sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre la longitud de raíz del cultivo de maíz.....	42
Tabla 17: Análisis de varianza sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre peso seco de raíz del cultivo de maíz .....	45
Tabla 18: ADEVA Sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre la longitud de raíz del cultivo de maíz .....	48

Tabla 19: Efecto de los tratamientos sobre el peso seco de raíz del maíz variedad “INIAP-101” a los 80 días de establecidas en condiciones de invernadero.....	48
Tabla 20: Medio Agar Rojo Congo ( <i>Azospirillum</i> sp.).....	61
Tabla 21: Medio Agar King B ( <i>Pseudomonas</i> ) .....	61
Tabla 22: Componentes del Caldo Nutritivo .....	61

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivos. ....	61
Anexo 2. Caldo Nutritivo.....	61
Anexo 3. Análisis de suelo.....	62

# EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE HERBICIDAS EN LA POBLACIÓN DE BACTERIAS PRESENTES EN UN BIOFERTILIZANTE APLICADO AL MAÍZ DE ALTURA, CUTUGLAGUA, PICHINCHA.

Autor: Tobar Andrade Carla Yadira

Universidad Técnica del Norte

Correo: carlayadira93@gmail.com

## RESUMEN

La agricultura moderna se fundamenta en el uso de insumos sintéticos, que influyen directa o indirectamente sobre los microorganismos del suelo y sus procesos. Esta investigación se desarrolló conjuntamente con el INIAP, con el objetivo de evaluar el efecto de herbicidas en la población de bacterias presentes en un biofertilizante aplicado al cultivo de maíz de altura (*Zea mays* L.). Para cumplir el objetivo propuesto se sometieron las cepas bacterianas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens*, al contacto directo con herbicidas (glifosato, paraquat y atrazina), evaluándose la presencia de estas mediante conteo directo en placas. Los resultados *in-vitro* revelaron, que ambas cepas toleraron el glifosato. En el añadido con atrazina se encontró una disminución del 99% frente al testigo con la cepa *Pseudomonas fluorescens*; pero, al usar paraquat el crecimiento fue nulo para ambas. En los ensayos de campo la desinfección de semilla, la inoculación y los herbicidas influyeron directamente en las variables agronómicas del cultivo. La capacidad bacteriana para crecer bajo estos factores fue similar en los tratamientos disminuyendo dos unidades logarítmicas, hallando al final del ensayo una biomasa de  $10^7$  UFC, pese a estos resultados estas cepas son promisorias debido a que alcanzo la concentración óptima para ejercer sus capacidades como bacterias promotoras del crecimiento vegetal mediante la síntesis de fitohormonas, solubilización de P y fijación de N. Estos resultados demuestran la viabilidad y sobrevivencia de estos microorganismos para ser aplicados en campos maiceros, conjuntamente con herbicidas para contribuir a una producción agrícola con un enfoque agroecológico.

**Palabras clave:** *Azospirillum* sp., *Pseudomonas fluorescens*, insumos sintéticos.

# EFFECT OF THE APPLICATION OF HERBICIDES ON THE POPULATION OF BACTERIA PRESENT IN A BIOFERTILIZER APPLIED TO HEIGHT CORN, CUTUGLAGUA, PICHINCHA

Autor: Tobar Andrade Carla Yadira

Universidad Técnica del Norte

Correo: carlayadira93@gmail.com

## ABSTRACT

Modern agriculture is based on the use of synthetic inputs, which directly or indirectly influence soil microorganisms and their processes. This research was developed jointly with INIAP, with the aim of evaluating the effect of herbicides on the population of bacteria present in a biofertilizer applied to the cultivation of highland corn (*Zea mays* L.). To meet the proposed objective, the bacterial strains of *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas fluorescens*, in direct contact with herbicides (glyphosate, paraquat and atrazine), evaluating their presence by direct plate count. The in-vitro results revealed that both strains tolerated glyphosate. In the addition with atrazine, a 99% decrease was found compared to the control with the *Pseudomonas fluorescens* strain; but when using paraquat the growth was null for both. In field trials, seed disinfection, inoculation and herbicides directly influenced the agronomic variables of the crop. The bacterial capacity to grow under these factors was similar in the treatments, decreasing two logarithmic units, finding at the end of the trial a biomass of  $10^7$  CFU, despite these results these strains are promising because they reach the optimal concentration to exercise their capacities as bacteria. plant growth promoters through the synthesis of phytohormones, solubilization of P and fixation of N. These results demonstrate the viability and survival of these microorganisms to be applied in corn fields, together with herbicides to contribute to agricultural production with an agroecological approach.

**Keywords:** *Azospirillum* sp., *Pseudomonas fluorescens*, synthetic inputs.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El maíz (*Zea mays* L.) es un componente básico dentro de la dieta en la población; además, es utilizado como fuente de materia prima para diferentes productos industriales. En relación a la superficie sembrada, este grano se ubicó en segundo lugar dentro de los cereales a nivel mundial después del trigo, siendo los mayores productores China, Estados Unidos y Brasil (Estadísticas Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAOSTAT], 2017).

En Ecuador la producción de maíz para el año 2018 llegó alrededor de un millón de toneladas, incrementándose este rubro en un 7.8% respecto al año 2017, con respecto a la Sierra ecuatoriana el maíz suave (maíz de altura), ocupa el primer lugar en superficie sembrada con 62 627 ha superando a otros cultivos como papa y fréjol con 23 493 y 11 785 ha, respectivamente (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2018).

Las prácticas agrícolas con el tiempo han sufrido una serie de transformaciones. La revolución verde es una de ellas y que aún se mantiene en muchos países, la cual está fundamentada en el uso de agroquímicos, pesticidas, plaguicidas, todo esto acompañado del uso de maquinaria pesada y monocultivos, incrementando notablemente el rendimiento de cultivos (Ceccon, 2008).

De acuerdo a datos registrados por FAOSTAT, en el período 2017 a nivel mundial se consumieron 4 113 591 Tn de plaguicidas, de los cuales 34 252 Tn fueron utilizadas en Ecuador, los herbicidas son insumos que se emplean en mayor cantidad con un promedio de 49.35% (16 905 Tn), del consumo total de plaguicidas en el país (FAOSTAT, 2017). Siendo los herbicidas a base de glifosato los más utilizados a nivel mundial.

El glifosato es un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro, de acción foliar que ingresa a las células y es transportado hacia toda la planta incluyendo raíces; actúa inhibiendo la acción de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSP), que es la encargada de la

biosíntesis de aminoácidos aromáticos, disminuyendo la producción de proteínas, lo que afecta directamente a la respiración y el proceso fotosintético de las plantas (Anzalone, 2007).

Otro herbicida, muy utilizado por los agricultores en los campos de maíz es la atrazina un herbicida selectivo, que pertenece al grupo de las triazinas, su mecanismo de acción consiste en la inhibición del transporte de electrones en el fotosistema II, interrumpiendo el proceso fotosintético provocando una clorosis y necrosis en los tejidos de la planta (Pitty, 2018). Paraquat es un herbicida no móvil empleado con frecuencia en los campos, actúa atravesando la membrana celular, donde retiene los electrones a nivel del fotosistema, el área afectada se torna acuosa, amarillenta y bronceada, induciendo una necrosis a la planta hasta que llega a la muerte (Anzalone, 2007; Pitty, 2018).

El uso de los herbicidas dentro de la agricultura moderna, se ha convertido en una alternativa eficaz para el control de malezas; sin embargo, el constante uso de estos acarrea efectos como la resistencia de plantas invasoras, problemas de fitotoxicidad, contaminación de la superficie terrestre y efectos residuales en los recursos hídricos (Pereira et al., 2019). En lo que respecta a la biomasa microbiana del suelo, la aplicación de herbicidas en suelos con pH de 6-7, ocasiona un crecimiento poblacional a partir de los 21 días en bacterias, mientras que en hongos no existe un efecto significativo (Rose et al., 2016).

Por otra parte, la producción agrícola en varias regiones está adoptando técnicas de manejo agroecológicas, fundamentadas principalmente en la reducción de la dependencia de insumos externos y la promoción de los procesos biológicos a través de la fijación de nutrientes (Martín y Rivera, 2015). Existe la alternativa de utilizar inoculantes biológicos como los biofertilizantes, que contienen uno o varios microorganismos que actúan como reguladores de crecimiento y en algunos casos inhiben el desarrollo de fitopatógenos (Rueda et al., 2015).

Entre los principales microorganismos utilizados como biofertilizantes se encuentran las bacterias del género *Azospirillum*, conocidas por ser promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), debido a su capacidad de producir fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas y sideróforos) (Bashan, Holguin, Glick y Bashan, 2007; Rangel et al., 2011; Rueda et al., 2015). Otro microorganismo comúnmente usado como biofertilizante es *Pseudomonas fluorescens* Migula, que tiene la capacidad de solubilizar el fósforo mineral y orgánico, debido a que estas

bacterias producen ácidos orgánicos y fosfatasas; de la misma manera, son promotores del crecimiento vegetal y en algunos casos pueden ser utilizadas como agentes de control biológico (Santillana, 2006; Barreto, Valero, Muñoz y Peralta, 2007).

Chegini y Hassanpour (2015) investigaron la capacidad de *Pseudomonas fluorescens* Migula y *Pseudomonas putida* Trevisan en la biodegradación de atrazina en el suelo, los resultados mostraron que el porcentaje de descomposición más alta (73.92%), se logra cuando ambas especies fueron aplicadas juntas, por otra parte el estudio de Travaglia et al. (2015) indica que el uso de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas* sp., influye en la reducción de los contenidos residuales de herbicidas en los granos de maíz.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), cuenta con cepas nativas liofilizadas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula, estas bacterias se obtuvieron hace unos años a partir de aislamientos colectados en la rizósfera del cultivo de maíz en las principales provincias maiceras de la Sierra del Ecuador: Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo (Carrera, 2012; Pincay, 2014).

Con los estudios realizados a nivel de laboratorio y campo, se demuestra el potencial de estas rizobacterias como promotoras del crecimiento vegetal, ya que la aplicación del biofertilizante mejora la interacción planta-microorganismo y la síntesis de hormonas vegetales, permitiendo una mayor absorción de nutrientes, un mayor porcentaje de germinación, un incremento de longitud radicular y la biomasa vegetal, además, se aumenta el contenido de nitrógeno y fósforo foliar absorbido por la planta (Cool, 2010; Ortíz, 2010; Carrera, 2012; Sangoquiza, Yáñez y Borges, 2019).

En la actualidad estas cepas están siendo validadas en campo con agricultores, para comprobar los efectos benéficos al ser empleadas como una estrategia sostenible, que permitan mantener e incrementar la productividad del maíz.

## **1.2 Problema de investigación**

La mano de obra dentro de los espacios dedicados a la agricultura ha disminuido, debido a la migración campesina y el crecimiento urbano, por lo cual, muchos productores han introducido

dentro de las prácticas para el manejo de cultivos la aplicación de herbicidas con la finalidad de reducir costos de producción y contrarrestar la escasez de mano de obra.

El uso de herbicidas de contacto o sistémicos se ha intensificado durante los últimos años, siendo Ecuador uno de los cinco primeros países con mayor aplicación de estos (FAOSTAT, 2019). En el año 2017 se utilizaron 16 000 ton de herbicidas, incrementándose cuatro veces más el valor del año 2000 que fue de 4000 ton, de seguir este patrón de consumo podría existir una alteración en la población microbiana del suelo a mediano o largo plazo.

Por otra parte, no existe una base científica que demuestre la viabilidad, sobrevivencia y crecimiento bacteriano como resultado de la interacción entre la aplicación de herbicidas y el biofertilizante (Ferifacter), desarrollado por el Programa de Maíz, del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias a base de cepas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula. Esta interacción podría afectar la viabilidad de las bacterias limitando las posibilidades de respuesta a la inoculación.

### **1.3 Justificación**

La aplicación de bioinsumos en campo generalmente está acompañada con la aplicación de agroquímicos, durante los últimos años se ha intensificado el uso de fungicidas e insecticidas para el control de plagas y enfermedades en semillas, siendo una actividad necesaria para evitar problemas fitosanitarios, de la misma forma, la aplicación de herbicidas se ha incrementado ampliamente en la agricultura y son utilizados en diversas cantidades, lo que puede influir directa o indirectamente sobre los microorganismos del suelo y sus procesos.

El Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP ha desarrollado un biofertilizante experimental (Fertibacter) a base de cepas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula, el que se encuentra en proceso de validación en experimentos desarrollados por el Programa Coreano en Agricultura Internacional (KOPIA), en campos maiceros de la región Sierra. Una de las recomendaciones a los agricultores para la aplicación del producto es realizar labores culturales de forma tradicional, lo que conlleva a una de las principales limitantes para la aceptación de este, ya que la mayoría de los productores hacen uso de agroquímicos para el manejo de sus cultivos.

Las investigaciones a nivel experimental demuestran la eficacia de este producto, Pincay (2014) investigó el efecto que tiene *Pseudomonas* sp., en el desarrollo del cultivo de maíz, indicando resultados positivos de las cepas bacterianas (aI2, aI6, nI3, nI5, nP2, aB1, Ab5, nB1, nB2 y aC2), las cuales expresaron valores superiores respecto al testigo absoluto y al testigo fertilizado químicamente en cuanto a longitud de raíz, área foliar y acumulación de P en los tejidos.

*Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula tienen la capacidad de suministrar nutrientes requeridos por la planta para su desarrollo, esto lo señala el estudio realizado por Sangoquiza et al. (2019), en el cultivo de maíz quienes determinaron una mayor absorción de N con 24.49 kg de N ha<sup>-1</sup>, inoculando la semilla con *Azospirillum* sp., mientras que con la combinación de ambas bacterias, se obtuvo mayor absorción de fósforo total 10.86 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, superando al testigo con aplicación química.

En cuanto la eficacia de estas bacterias, en relación al rendimiento en el cultivo de maíz (estado choclo), al inocular la semilla con bacterias (*Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula), se obtuvo 19.70 ton ha<sup>-1</sup> en relación con el control químico que fue de 17.12 ton ha<sup>-1</sup> y el testigo absoluto que fue inferior a todos con 13.58 ton ha<sup>-1</sup> (Sangoquiza et al., 2019).

Sin embargo, se desconoce el efecto que podría causar el uso de herbicidas comunes sobre el crecimiento poblacional de estas bacterias. Poco se sabe sobre la interacción de la inoculación del biofertilizante con la aplicación de herbicidas agrícolas. Por tal razón, esta investigación generará información que permitirá conocer el grado de afectación de la aplicación de herbicidas sobre la actividad y sobrevivencia de estas bacterias.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de herbicidas en la población de bacterias presentes en un biofertilizante aplicado al maíz de altura.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de la aplicación de herbicidas sobre el crecimiento *in-vitro* de *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* NI5.
2. Evaluar el efecto de la aplicación de herbicidas sobre la población de *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* NI5 en el cultivo de maíz bajo invernadero.

## **1.5 Hipótesis**

Hipótesis nula: No existe un efecto de los herbicidas en el crecimiento poblacional de las bacterias *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5.

Hipótesis alternativa: Existe un efecto de los herbicidas en el crecimiento poblacional de las bacterias *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5.

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

### 2.1 Origen e importancia del maíz *Zea mays* L.

Bennetzen y Hake (2009), señalan que el maíz es una planta C4 que se adapta a suelos profundos ricos en materia orgánica, además, es un cultivo de ciclo corto que requiere una temperatura de 15-25 °C y mantener una humedad adecuada según la capacidad de campo durante todas sus etapas fenológicas. El ciclo de cultivo es de 170 a 215 días desde la siembra hasta la cosecha (Yáñez, Zambrano y Caicedo, 2013).

Según Acosta (2009), el maíz es originario de Mesoamérica principalmente de México, donde actualmente existen alrededor de 65 razas. Ecuador también, es un país con altos niveles de biodiversidad donde se han identificado 29 razas del cultivo, de las cuales 17 pertenecen a la Sierra (Yáñez et al., 2013).

El Banco Central del Ecuador (2019) señala que las exportaciones de este producto se incrementaron de 36.9 toneladas vendidas en el año 2016 a 39 Tn en 2017, de igual forma las importaciones presentaron un crecimiento, ya que pasaron de 3 221.9 Tm en similar período del año 2016 a 3 592.8 Tm en el 2017. La mayor parte de la importación fue destinada para siembra.

La producción de maíz en la Sierra ecuatoriana es representativa de la agricultura familiar, el área de producción se encuentra entre 1-5 ha; tiene como destino el autoconsumo y la comercialización dentro de los mercados mayoristas y minoristas (Bravo y León, 2013).

### 2.2 Manejo del cultivo de maíz

Las labores culturales empiezan con la preparación del terreno (arado, rastra y surcado), realizadas dos meses antes de la siembra a inicios de la temporada de lluvias que va desde junio hasta los primeros días de agosto, aproximadamente se siembran 30 kg ha<sup>-1</sup>. Seguidamente del raleo (dejar dos plantas por golpe), rascadillo (eliminar las malezas y en romper la costra), para promover el desarrollo de raíces y aporque (arrimar tierra a alrededor del tallo) (Yáñez et al., 2013).

La fertilización química se aplica al momento de la siembra y durante las etapas de crecimiento de la planta. El nitrógeno se aplica 45 días después de la siembra conjuntamente con la actividad de aporque (Yáñez et al., 2013). Los elementos con mayor exigencia por el cultivo son nitrógeno, fósforo y potasio; los cuales se suplementan utilizando productos como urea, sulfato amónico, cloruro de potasio, fosfato diamónico, superfosfato triple y sulfato de potasio que se aplican con el objetivo de mantener una buena producción e incrementar los rendimientos (González et al., 2015).

El riego se puede realizar mediante gravedad o por goteo, conservando la humedad adecuada durante las fases de crecimiento, es recomendable regar de 10 a 15 días antes de la floración con la finalidad de obtener una correcta formación y llenado de grano, mientras que en la etapa de engrose y maduración de la mazorca se debe disminuir la cantidad de agua aplicada (Yáñez et al., 2013).

El control de maleza en áreas grandes se realiza mayormente con herbicidas empleando pulverizadores o bombas de fumigar, sobre la cobertura vegetal de plantas no deseadas, los productos más utilizados son glifosato y paraquat, los que presentan un control efectivo sin afectar el desarrollo fisiológico del maíz (Rao, 2000).

## **2.3 Control de malezas mediante herbicidas**

Según Rao (2000), la pérdida anual total de productos agrícolas que enfrentan los agricultores a causa de diversas plagas es la siguiente: las malezas representan el 45%, los insectos el 30%, las enfermedades el 20% y mascotas el 5%. Los herbicidas son de gran importancia en el manejo de malezas en los distintos sistemas agrícolas, existen aproximadamente más de 600 formulados comerciales, elaborados con más de 100 sustancias activas (Taberner, Cirujeda y Zaragoza, 2007). Estos compuestos fitosanitarios tienen la capacidad de alterar los procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas invasoras que compiten por factores como luz, agua y nutrientes causando la muerte o desarrollo anormal de las mismas (Arias, Mora y Romero, 2019).

### **2.3.1 Clasificación de herbicidas según el modo de acción**

El modo de acción de los herbicidas está asociado a la fragmentación química y al ingrediente activo del producto, estas sustancias ingresan por medio de las raíces o partes aéreas de la planta

alterando los procesos metabólicos de las mismas (Anzalone, 2007). A continuación, se describe la clasificación de los herbicidas de acuerdo a los modos de acción que presentan:

- **Inhibidores de la fotosíntesis:** Estos herbicidas interfieren con los procesos de fotosíntesis, inhiben el transporte de electrones evitando la fotólisis de las moléculas de agua y la liberación de oxígeno provocando la destrucción de la clorofila y carotenoides, lo que ocasiona clorosis y la muerte de la planta, así como la inhibición de la transferencia de energía (Anzalone, 2007).

Dentro de este grupo se encuentra las Triazinas, que son herbicidas granulados que deben estar acompañados por aditivos dispersantes y humectantes, debido a su baja solubilidad en el agua, su acción se centra fundamentalmente en arbustos de hoja ancha. Este tipo de herbicidas son conocidos como de amplio espectro (López, 2018).

La atrazina es un herbicida de contacto el cual se administra mediante aspersion en el follaje, ingresa por difusión hacia las raíces, se transporta por el xilema hasta llegar a las hojas, provocando la muerte de plantas no deseadas (López, 2018). El maíz (*Zea mays* L.), y el sorgo (*Sorghum* spp.), poseen niveles altos de enzimas denominadas glutatión transferasas (GSTs) que promueven la resistencia de estos cultivos a la aplicación de atrazina (Anzalone, 2007).

Otro herbicida dentro de este grupo es paraquat de translocación limitada y que debe ser aplicado al suelo, actúa atravesando la membrana plasmática de la célula sobre el transportador de prutescina, además secuestra electrones a nivel del fotosistema, donde provoca alteraciones y reducción de la sustancia ferredoxina, lo que produce la muerte a las plantas invasoras (Anzalone, 2007).

- **Inhibidores de la síntesis de lípidos:** Inhiben la enzima acetil CoA deshidrogenasa, la que es encargada de la formación de ácidos grasos, al perder estas cadenas la planta finaliza el proceso de división celular. Al cabo de 10-12 días después de la aplicación, se observa daño en la base de las hojas jóvenes, la planta presenta una necrosis en el tejido meristemático ocasionándole la muerte (Anzalone, 2007; López, 2018).

Las gramíneas (malezas), son eficientemente controladas por herbicidas como el fluazifop-P-butil, producen síntomas como: inhibición del crecimiento en los meristemas apicales, pérdida de la membrana plasmática, inducción del etileno,

necrosis en hojas y tallo; paralizando el crecimiento de brotes jóvenes (Anzalone, 2007; López, 2018).

- **Inhibidores de la síntesis de aminoácidos:** Los herbicidas que pertenecen a este grupo interrumpen la acción de la enzima encargada de la biosíntesis de los aminoácidos, y con ello el metabolismo de la planta, desencadenando la falta de fijación de CO<sub>2</sub>, ocasionando así la deshidratación de los tejidos vegetales, el glufosinato amónico, es un herbicida que se encuentra dentro de este grupo (López, 2018).

Otro producto con mayor demanda y ventas dentro de este grupo es el glifosato, un herbicida sistémico no selectivo de amplio espectro, altamente soluble en agua el que es aplicado al follaje, ingresando a las células y transportado por el floema hacia toda la planta incluyendo raíces; actúa inhibiendo la acción de la enzima 5-enolpiruvilshikímato-3-fosfato sintetasa (EPSP sintetasa), por lo que se inhibe la síntesis de chorismato y, en consecuencia, la síntesis de triptófano, tirosina y fenilalanina ocasionando notablemente una reducción del proceso fotosintético (Anzalone, 2007; García, 2018).

- **Herbicidas inhibidores de la síntesis de pigmentos fotosintéticos:** Los herbicidas que inhiben la síntesis de clorofila actúan inhibiendo la enzima PROTOX, interfiriendo en la síntesis de clorofila, peroxidación de los lípidos de la membrana celular, causando necrosis grave en los tejidos de las plantas, además, provoca la decoloración al bloquear la síntesis de carotenoides en el tallo emergente. El norflurazon es un compuesto dentro de este grupo que paraliza la síntesis de carotenoides lo que genera una acumulación de energía en la molécula de clorofila y su posterior destrucción (Anzalone, 2007; López, 2018).
- **Herbicidas inhibidores de la división celular:** Los herbicidas que pertenecen a este grupo afectan directamente la mitosis celular inhibiendo la formación de microtúbulos que cumplen funciones importantes en la morfogénesis de la célula como la división y expansión celular, deteniendo el proceso en la profase, con el fin de impedir la formación de células hijas (Anzalone, 2007). Herbicidas como dinitroanilinas inhiben la mitosis y se aplican al suelo exponiendo directamente las raíces de las malezas al producto, lo que provoca un abultamiento anormal (tumor), generando la detención de la mitosis y consecutivamente la muerte de la planta (López, 2018).

- **Herbicidas hormonales:** Son productos que se asemejan a fitohormonas, confundiendo y alterando el sistema hormonal, en los herbicidas tipo auxinas el mecanismo de acción es la fijación en los coloides del suelo, para luego llegar a la planta mediante la adsorción por las raíces, estas hormonas sintetizan el etileno por oxidación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la enzima oxidasa, lo que causa altos niveles de cianina, que inhibe el metabolismo de las células (Anzalone, 2007; López, 2018).

El 2,4-D amida es representativo dentro de este grupo, utilizado en gramíneas provocando anomalías en el crecimiento y la reproducción, generando inflorescencias estériles, también afecta los nuevos brotes, las raíces y provoca tallos frágiles (Anzalone, 2007).

### **2.3.2 Efectos del uso de herbicidas**

El constante y mal uso de productos químicos para el control de malezas, ocasionan problemas de fitotoxicidad sobre los cultivos, inducen la resistencia de malezas a los herbicidas, producen efectos residuales en la superficie terrestre en las primeras capas, provocando la muerte de algunos microorganismos presentes en el suelo y efectos directos a la salud del agricultor, al inhalar los residuos volátiles de la aplicación de los herbicidas (Benito, Magnoli y Barberis 2018).

Además, el uso intensivo de agroquímicos en la producción de cultivos para incrementar los rendimientos, está estrechamente ligada a la disminución del margen de ganancia, para los productores dado el elevado costo de los insumos para la producción (González et al., 2015).

Por otra parte, los herbicidas tienen un impacto inicialmente negativo en el desarrollo de microorganismos y propiedades del suelo, Florida, López y Pocomucha (2012) indican que la aplicación de glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos, vitaminas, lignina, alcaloides y flavonoides sobre las rizobacterias, no obstante, las que sobreviven a este químico generan mecanismos de resistencia al producto, incrementando su población en tiempos más largos y contribuyen a la degradación del glifosato, lo mismo sucede con paraquat que al inicio

disminuye la población y a medida que se aumenta la dosis hay un aumento en el crecimiento poblacional bacteriano.

## **2.4 Alternativas de manejo de cultivos**

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el estudio sobre la implementación de alternativas ecológicas y amigables con el ambiente, como son los abonos verdes que consisten en la incorporación de materia en descomposición, para incrementar la disponibilidad de nutrientes; coberturas vegetales que ayudan a disminuir la erosión de los suelos; aplicación de materia orgánica con residuos de los animales; controladores biológicos para disminuir la presencia de plagas y el uso de microorganismos como biofertilizantes para estimular del crecimiento vegetal (Martín y Rivera, 2015).

## **2.5 Biofertilizantes**

Los biofertilizantes son productos biológicamente activos a base de células vivas o latentes que contienen cepas de microorganismos como bacterias, hongos y algas, que al ser reactivadas aceleran procesos microbianos, aumentando la disponibilidad de nutrientes que mejoran el crecimiento y desarrollo de las plantas, también, pueden ser oxidantes de azufre, descomponedores de materia orgánica, fijadores de nitrógeno o solubilizadores de fósforo; por otra parte, sirven para minimizar los riesgos en la salud causados por el uso inadecuado de fertilizantes químicos (Kawalekar, 2013; Sindhu, Parmar, Phour y Sehwat, 2016).

La aplicación de biofertilizantes provenientes de microorganismos benéficos asociados a las raíces de las plantas ayuda a mejorar el crecimiento, desarrollo de los cultivos (Barreto et al., 2007). Estos microorganismos se encuentran en la rizósfera del cultivo, transformando los exudados radicales en fitohormonas para ser absorbidas por las raíces, los minerales a base de nitrógeno, fósforo, magnesio, son los que se consumen en mayor cantidad por la planta, entre los géneros de rizobacterias más utilizados como microorganismos promotores del crecimiento vegetal se encuentran; *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* (Reyes, Alvares, Elayoubi y Valeria, 2008).

### **2.5.1 Bacterias del género *Azospirillum***

El género *Azospirillum*, pertenece a la clase Alphaproteobacteria, Gram negativas, están cubiertas por una capa externa formada por lipopolisacáridos y exopolisacáridos, estas rizobacterias son fijadoras de nitrógeno (N<sub>2</sub>), de vida libre, que se encuentran en estrecha asociación con raíces de pastos y cereales, tienen forma de espirilos u ovoide, miden entre 0.8 a 5 micrómetros, son células móviles que pueden adaptar su flagelación a diferentes ambientes (Parra y Cuevas, 2001; Baldani, Krieg, Baldani, Hartmann y Döbereiner, 2005).

La colonización de *Azospirillum* sp. sobre las plantas se presenta de dos formas, una donde la población bacteriana se localiza en la capa del mucilago de la superficie de la raíz y otra donde las bacterias se encuentran internamente en los espacios intercelulares de la corteza radical. Al colonizar las raíces esta bacteria produce sustancias que inducen variaciones significativas en diferentes parámetros del desarrollo y crecimiento de los cultivos, en el sistema radicular se incrementa el crecimiento y la densidad de raíces, lo que permite mayor absorción de agua y nutrientes; respecto a la parte aérea, se aumenta el contenido de nitrógeno, el número de hojas, granos y brotes, la altura de planta, el índice de área foliar y la tasa de germinación (Parra y Cuevas, 2001).

Estas bacterias son de gran importancia en la agricultura moderna, se utilizan comúnmente en bioinsumos o biofertilizante como promotores de crecimiento, debido a su capacidad de fijar nitrógeno biológico y la producción de fitohormonas que estimulan el desarrollo de cultivos de interés; por otra parte, muestran potencial para degradar contaminantes orgánicos del suelo (Bashan et al., 2007).

El estudio realizado por García, Mendoza y Mayek (2012), demostraron que la inoculación de *Azospirillum brasilens* Tarrand, Krieg et döbereiner, influyó directamente en el incremento del rendimiento de grano de maíz a campo abierto hasta en un 30%, de igual forma la relación beneficio costo aumentó al 56%.

### **2.5.2 Bacterias del género *Pseudomonas***

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos rectos o levemente curvos miden de 0.5-10 y 1.5-5 micrómetros de diámetro y largo respectivamente, poseen un

metabolismo oxidativo no fermentativo y tienen la capacidad de adaptarse a varios nichos como el suelo o ambientes contaminados, pero son ampliamente estudiadas en el cultivo de maíz, por la capacidad de adherirse con facilidad a la semilla (Prescott, Harley y Klein, 2004; Wu et al., 2011).

Son bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), que producen fitohormonas y vitaminas, que estimulan la germinación de semillas, la inhibición de la síntesis de etileno y el desarrollo de raíces (Fgaier y Eberl, 2010). Estos microorganismos tienen la capacidad de solubilizar fosfatos, transformando fosfatos insolubles en formas solubles por medio de procesos de acidificación, quelación, reacciones de intercambio y producción de ácido glucónico (Chung et al., 2005).

Por otra parte, pueden actuar como agentes de control biológico (BCA), debido a su capacidad para proteger a las plantas de infecciones causadas por patógenos, mediante la síntesis de antibióticos y fungicidas, competencia por nutrientes, producción de sideróforos o por la inducción de la resistencia sistémica a patógenos (Cano, 2011).

Santillana (2006), utilizó *Pseudomonas* sp., obteniendo una viabilidad de las bacterias hasta los tres meses posteriores a la siembra constatando un sinergismo entre el hospedante y las bacterias, que junto con las fitohormonas que excretan las raíces provocan un mayor desarrollo foliar de las plantas.

## **2.6 Marco legal**

El fundamento legal de esta investigación está basado en la Constitución de la República del Ecuador, que fue publicada en el R. O. No. 449 del 20 de octubre de 2008 (Constitución de la República del Ecuador, 2008).

Art. 14.- Derecho de un ambiente sano. - se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kaawsay*. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados.

Art. 15.- Uso de tecnologías no contaminantes. - El estado promoverá, en el sector público y privado, el uso de tecnologías ambientalmente limpias y de energías alternativas no contaminantes y de bajo impacto. La soberanía energética no se alcanzará en detrimento de la soberanía alimentaria, ni afectará el derecho del agua.

Los numerales 3, 8 y 9 del Artículo 281, de la Constitución de la República establecen las responsabilidades del Estado para alcanzar la soberanía alimentaria, entre las que se incluyen: fortalecer la diversificación y la introducción de tecnologías ecológicas y orgánicas en la producción agropecuaria; asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiadas para garantizar la soberanía alimentaria; regular bajo normas de bioseguridad el uso y desarrollo de biotecnología, así como su experimentación, uso y comercialización.

El Artículo 276, numeral 4 de la Constitución, que nos habla de recuperar y conservar la naturaleza y mantener un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente y de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural.

El Artículo 3 políticas agrarias

literal i) de la ley de desarrollo agrario codificación 2004 – 02 establece la fijación de un sistema de libre importación para la adquisición de maquinarias, equipos, animales, abonos, pesticidas e insumos agrícolas, así como de materias primas para la elaboración de estos insumos, sin más restricciones que las indispensables para mantener la estabilidad del ecosistema, la racional conservación del medio ambiente y la defensa de los recursos naturales;

Art. 18.- medidas ecológicas.- de la ley de desarrollo agrario codificación 2004 – 02, establece que el ministerio de Agricultura y Ganadería, a través de sus organismos especializados, adoptará las medidas aconsejadas por las consideraciones ecológicas que garanticen la utilización racional del suelo y exigirá que las personas naturales o jurídicas que realicen actividades agrícolas, pecuarias, forestales u obras de infraestructura que afecten negativamente a los suelos, adopten las medidas de conservación y recuperación

# CAPÍTULO III

## MARCO METODOLÓGICO

### 3.1 Descripción del área de estudio

La presente investigación, se desarrolló en los predios de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Tabla 1). Los datos de las características climáticas del invernadero se detallan en la Tabla 2.

**Tabla 1**

*Características del área de estudio*

Sitio	“Est. Exp. Santa Catalina”
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Altitud	3058 m.s.n.m.
Latitud	00 <sup>0</sup> 22' 00' S.
Longitud	78 <sup>0</sup> 33' 00' W.

**Tabla 2**

*Parámetros climáticos del invernadero*

Parámetro climático	Promedio
Temperatura promedio	20 °C
Humedad relativa	71%

*Fuente:* Galvis y Adolfo (2017).

### 3.2 Material experimental

Los materiales empleados durante la investigación se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Materiales del experimento*

Materiales	Equipos	Insumos
Reactivos medios de cultivo	Cámara de flujo laminar	Biofertilizante a base de <i>Azospirillum</i> sp. C2 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5 (Concentración 10 <sup>9</sup> UFC)
Fundas de vivero	Autoclave	Herbicidas: glifosato, paraquat y atrazina
Regadera	Balanza	Semillas de maíz variedad INIAP-101
Materiales de vidrio	Incubadora	Reactivos medios de cultivo
Computador	Espectrofotómetro	

### 3.3 Métodos

Esta investigación es de tipo experimental, para la cual se establecieron dos experimentos el primero es *in-vitro* y el segundo bajo invernadero con el objetivo de evaluar la población de bacterias presentes en el biofertilizante.

#### 3.3.1 Experimento 1 (*in-vitro*)

Se evaluó el crecimiento poblacional de las cepas (*Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* NI5), bajo la aplicación de tres herbicidas en condiciones de laboratorio.

##### 3.3.1.1 Factores en estudio

- **Factor A:** Bacteria

El factor A está conformado por las bacterias y se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Cepas de bacterias*

Código	Identificación
C1	<i>Azospirillum</i> sp. C2
C2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5

- **Factor B:** Herbicidas

El factor B está conformado por los herbicidas a utilizarse y se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Concentración de los herbicidas*

Código	Identificación
H1	Glifosato concentración (480 g l <sup>-1</sup> )*
H2	Paraquat concentración (200 g l <sup>-1</sup> )*
H3	Atrazina concentración (900 g kg <sup>-1</sup> )*
HT	Testigo sin herbicida

\* Concentración de ingrediente activo por l o kg de producto

##### 3.3.1.2 Tratamientos

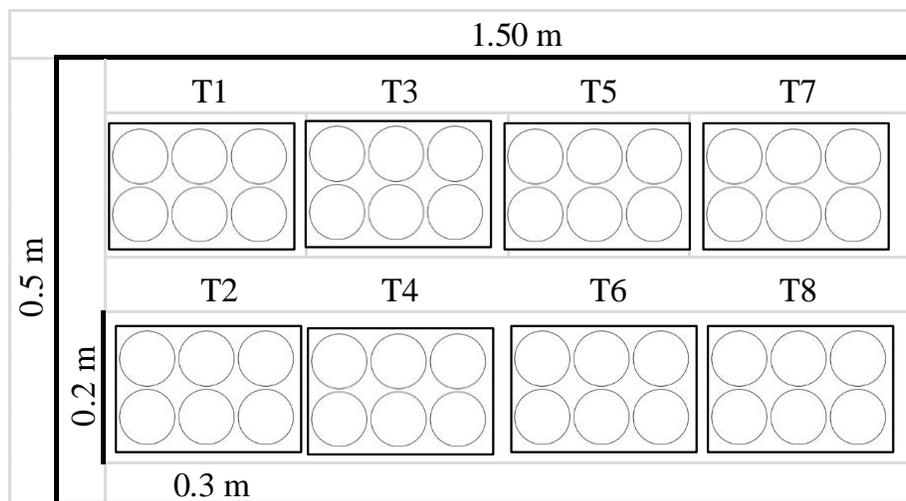
Los tratamientos evaluados son 8 que son el resultado de la interacción entre los dos factores de estudio, los cuales se encuentran descritos en la Tabla 6.

**Tabla 6***Tratamientos a evaluarse*

Tratamientos	Código	Descripción
T1	C1+H1	<i>Azospirillum</i> sp. C2 + glifosato
T2	C1+H2	<i>Azospirillum</i> sp. C2 + paraquat
T3	C1+H3	<i>Azospirillum</i> sp. C2 + atrazina
T4	C1+HT	<i>Azospirillum</i> sp. C2 sin herbicida
T5	C2+H1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5 + glifosato
T6	C2+H2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5 + paraquat
T7	C2+H3	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5 + atrazina
T8	C2+HT	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NI5 sin herbicida

### 3.3.1.3 Diseño experimental

Para la investigación se implementó un diseño completamente al azar (DCA), con seis observaciones por tratamiento (Figura 1).

**Figura 1.** Distribución de los tratamientos *in-vitro*- (DCA).

### 3.3.1.4 Características del experimento

Las características del experimento *in-vitro* corresponden a cada bacteria por separado y se detallan a continuación:

- Tratamientos: 4
- Observaciones: 6
- Número de unidades experimentales: 24
- Área del experimento: 0.75 m<sup>2</sup>

### 3.3.1.5 Características de la unidad experimental

Para cada unidad experimental se utilizó un plato Petri con medio de cultivo sólido Agar-rojo congo para el caso de *Azospirillum* sp. y King B para *Pseudomonas fluorescens* Migula.

- Diámetro: 100 mm
- Altura: 15 mm
- Número de platos Petri por unidad experimental: 6
- Cantidad de inóculo por plato Petri: 100 µl

### 3.3.1.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron modelos lineales generales y mixtos en el software INFOSTAT (Tabla 7). Se verificó que se cumpliera con el supuesto de normalidad; transformando la variable con el logaritmo base 10 para normalizar los datos. El ANOVA, se realizó por cada especie de bacteria en estudio.

**Tabla 7**

*Esquema de la ADEVA en Diseño completamente al azar por bacteria en estudio*

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	25
Tratamientos	5
Herbicidas (H)	5
Observaciones	6
Error experimental	9

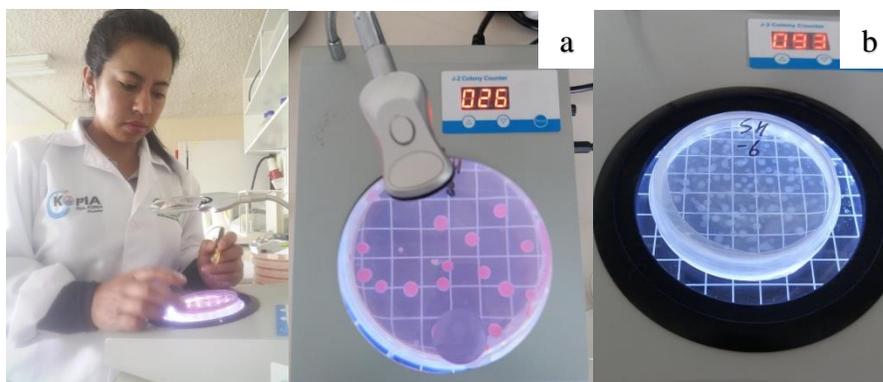
### 3.3.1.7 Variables a evaluar

Las variables a evaluar en el experimento se detallan a continuación.

#### **Crecimiento poblacional de bacterias**

Para la evaluación de la resistencia *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5, a los herbicidas, se realizaron diluciones. A partir de estas se tomaron las diluciones de  $10^{-5}$  hasta  $10^{-8}$ , las cuales fueron sembradas en cajas Petri que contenían medios de cultivo Agar rojo-congo para el caso de *Azospirillum* sp., y King B para *Pseudomonas fluorescens* Migula (Anexo 1) y los herbicidas.

El crecimiento poblacional de las bacterias se determinó a las 48 y 72 horas (Figura 2) después de la inoculación e incubación a  $28 \pm 2$  °C, mediante la técnica de recuento de colonias en platos Petri y se expresó en número de UFC/ml (Ruíz, Gómez y Villamizar, 2015).



**Figura 2.** Conteo de colonias: a) *Azospirillum* sp. b) *Pseudomonas fluorescens* Migula

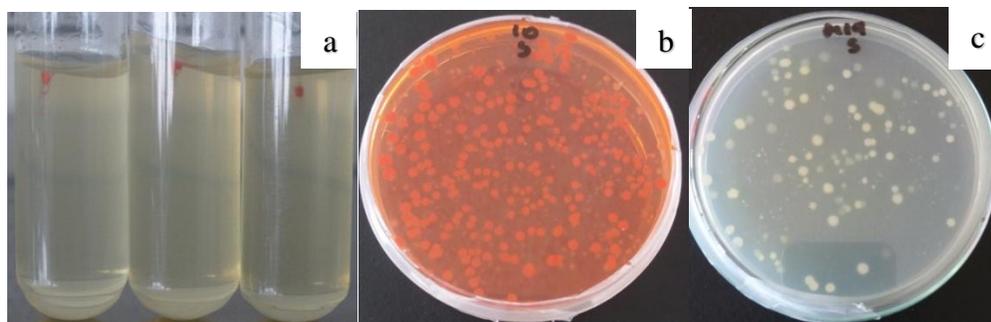
### 3.3.1.8 Manejo específico del experimento

El procedimiento que se empleó para el desarrollo del experimento se detalla a continuación.

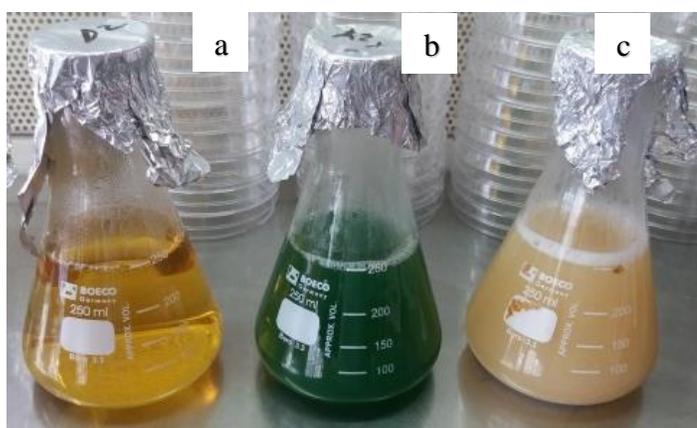
Determinación de la concentración inicial: Se empleó la cepa *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5, que fueron proporcionadas por el laboratorio del Programa de Maíz, INIAP. A continuación, fueron colocadas las cepas liofilizadas en los tubos de ensayo que contenían caldo nutritivo (Anexo 2). Luego se incubaron a una temperatura de 30 °C por 4 horas, obteniendo de esa forma una solución madre.

A partir de esta se desarrollaron las diluciones seriadas, para ello se agregó 1 ml de muestra en 9 ml de diluyente y se tomó las diluciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-8}$ , las que fueron sembradas en Placas Petri con el medio de cultivo sólido ácido málico- Agar-Rojo Congo para el caso de *Azospirillum* sp. y King B para *Pseudomonas fluorescens* Migula (Figura 3) y con la ayuda de una espátula de Drigalski se dispersó bien hasta la sequedad. Posteriormente, se incubaron a una temperatura de 30 °C por 24 horas.

Aplicación del herbicida: Luego de la esterilización de los medios de cultivos se dejó reposar por el lapso de 2 horas alcanzando una temperatura de 30 °C, se agregó los herbicidas. Las dosis utilizadas fueron: 15 ml de glifosato de acuerdo a la dosis comercial ( $3 \text{ l ha}^{-1}$ ), 15 ml de paraquat ( $3 \text{ l ha}^{-1}$ ) y 10 g de atrazina ( $2 \text{ kg ha}^{-1}$ ) en un litro de medio de cultivo (Figura 4). Posteriormente se dispensó 20 ml de medio por caja Petri.

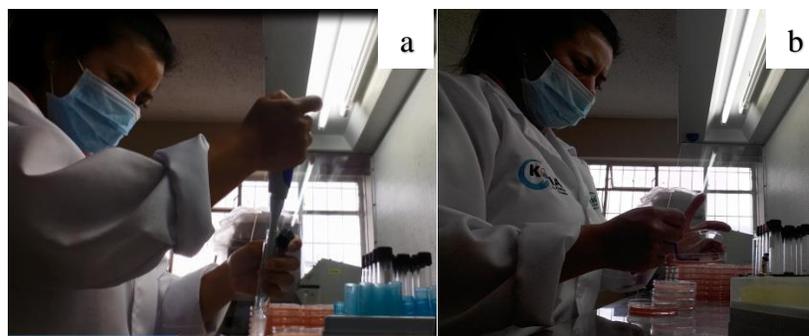


**Figura 3.** Concentración bacteriana: a) Cepas bacterianas inmersas en caldo nutritivo. b) Crecimiento de *Azospirillum* sp. c) Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*.



**Figura 4.** Medio de cultivo King B con herbicidas: a) glifosato b) paraquat c) atrazina.

Siembra de cepas: A partir de la solución madre se realizó las diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$ , que consiste en tomar 1 ml de solución y depositar en los tubos de ensayo que contienen 9 ml de agua destilada estéril, así sucesivamente hasta obtener las diluciones necesarias. Luego se tomaron 100  $\mu$ l del inóculo de las diluciones:  $10^{-5}$  hasta  $10^{-8}$  y se colocaron en Placas Petri (Figura 5), con los herbicidas a evaluarse. Luego se selló herméticamente las placas Petri con papel Parafilm con la finalidad de evitar contaminación. Finalmente se incubaron a una temperatura de 30 °C por 72 horas.



**Figura 5.** Siembra de cepas: a) Diluciones de la solución madre b) Siembra de cepas en sus respectivos medios.

### 3.3.2. Experimento 2 (Plantas de maíz)

En esta fase de la investigación fue evaluado el crecimiento poblacional de las bacterias *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5, con la aplicación de tres herbicidas y el tratamiento de desinfección, en el cultivo de maíz, bajo condiciones de invernadero.

#### 3.3.2.1 Factores en estudio

Los factores en el estudio durante la segunda parte de la investigación fueron dos: Factor A (Desinfección de la semilla) y Factor B (Herbicidas). El factor A estuvo integrado por los desinfectantes utilizados los que se detallan en la Tabla 8; mientras, que el factor B estuvo conformado por los herbicidas aplicados (Tabla 9).

**Tabla 8**

*Tratamiento de desinfección de la semilla*

Código	Identificación
S1	Semilla de la variedad INIAP-101 sin desinfectar
S2	Semilla de la variedad INIAP-101 desinfectada con fludioxonil

**Tabla 9**

*Concentración de los herbicidas*

Código	Identificación
H1	Glifosato concentración (480 g l <sup>-1</sup> )*
H2	Paraquat concentración (200 g l <sup>-1</sup> )*
H3	Atrazina concentración (900 g kg <sup>-1</sup> )*
H4	Glifosato + paraquat + atrazina
HT	Testigo sin herbicida

\* Concentración de ingrediente activo por l o kg de producto

### 3.3.2.2 Tratamientos

Los tratamientos evaluados son 10 que resultaron de la interacción entre los dos factores de estudio (Tabla 10).

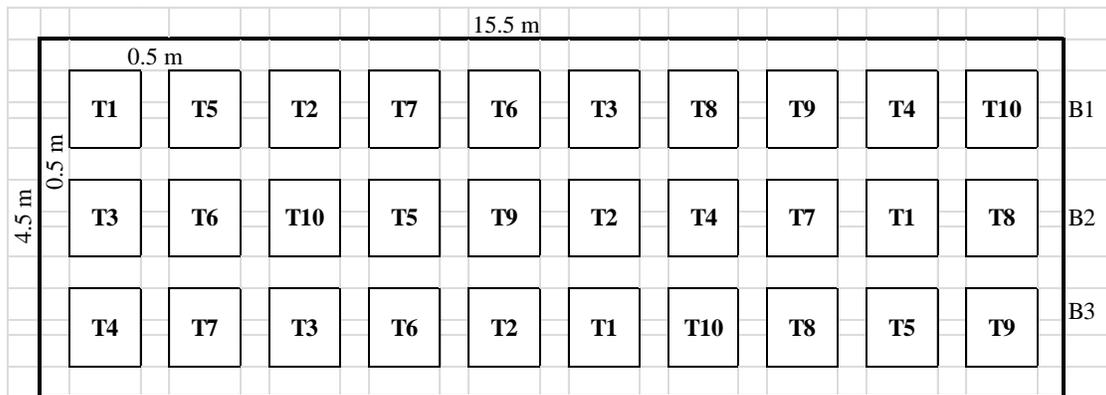
**Tabla 10**

*Tratamientos a evaluarse*

Tratamientos	Código	Descripción
T1	S1+H1	Semilla sin desinfectar + glifosato
T2	S1+H2	Semilla sin desinfectar + paraquat
T3	S1+H3	Semilla sin desinfectar + atrazina
T4	S1+H4	Semilla sin desinfectar + glifosato + paraquat + atrazina
T5	S1+HT	Semilla sin desinfectar sin herbicida
T6	S2+H1	Semilla con fludioxonil + glifosato
T7	S2+H2	Semilla con fludioxonil + paraquat
T8	S2+H3	Semilla con fludioxonil + atrazina
T9	S2+H4	Semilla con fludioxonil + glifosato + paraquat + atrazina
T10	S2+HT	Semilla con fludioxonil sin herbicida

### 3.3.2.3 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (DBCA), con tres repeticiones (Figura 6).



**Figura 6.** Distribución de los tratamientos invernadero-(DBCA).

### 3.3.2.4 Características del experimento

Las características del segundo experimento en esta investigación son las siguientes:

- Tratamientos: 10
- Bloques: 3
- Número total de unidades experimentales: 30
- Área del experimento: 69.75 m<sup>2</sup>

### 3.3.2.5 Características de la unidad experimental

Para el experimento 2 se utilizaron 10 fundas plásticas de color negro con perforaciones por tratamiento, con las siguientes características:

- Ancho: 0.25 m
- Altura: 0.30 m
- Área: 0.02 m<sup>2</sup>
- kg de sustrato por recipiente: 2 kg
- Número de plantas por funda: 1

### 3.3.2.6 Análisis estadístico

Se utilizó el software INFOSTAT, para realizar el análisis estadístico. El esquema del análisis de varianza (ADEVA), para el experimento se observa en la Tabla 11. El ANOVA, se realizó por cada especie de bacteria en estudio.

**Tabla 11**

*Esquema del ADEVA en diseño completamente al azar*

Fuente de variación	Grados de libertad
TOTAL	29
Desinfección (D)	1
Herbicidas (H)	4
D x H	4
Bloques	2
Error experimental	18

### 3.3.2.7 Variables a evaluar

Las variables a evaluar en el segundo experimento se detallan a continuación

#### 1. Colonización de bacterias

Esta variable se analizó, tomando al azar dos plantas por tratamiento en cada repetición a los 20, 40, 60 días (fase vegetativa V3, V10, y VT)<sup>1</sup> y 80 días (fase reproductiva R1)<sup>2</sup>. Previamente todas las herramientas se esterilizaron con etanol al 70%. Luego se tomaron muestras del suelo rizosférico del cultivo de maíz (10 gramos), y fueron colocadas en fundas de polipropileno estériles (Figura 7), etiquetadas y almacenadas en un cooler a 4 °C, para su transporte al

<sup>1</sup> V3, tercera hoja; V10, “n” ésima hoja; VT, panojamiento.

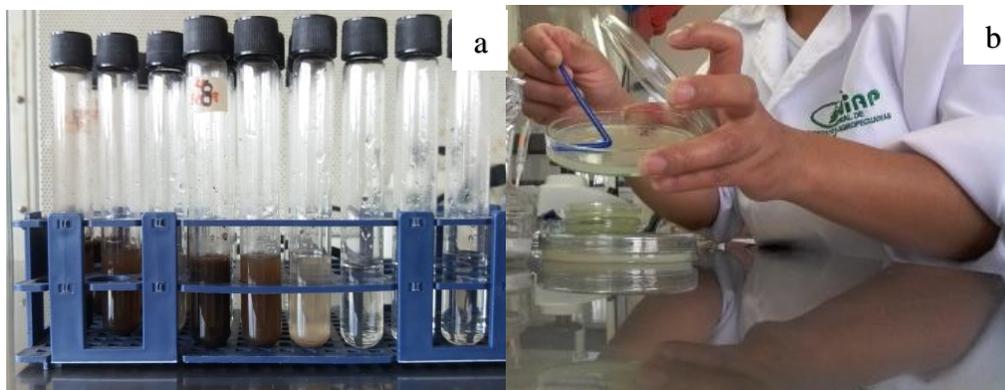
<sup>2</sup> R1, emergencia de estigmas.

laboratorio del Programa de Maíz de la EESC, para los respectivos aislamientos (Romero et al., 2017). Las respuestas que se obtienen son expresadas en Unidades Formadoras de Colonia (UFC), en numeración exponencial en base 10 y será el promedio de las dos plantas evaluadas por tratamiento. La metodología aplicada para el procesamiento de muestras fue la siguiente:



**Figura 7.** Muestreo de suelo: a) Extracción de la rizósfera de maíz. b) Etiquetado de muestras.

- a) Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* Migula: De la muestra del suelo rizosférico del cultivo de maíz, se pesó 1 g de suelo y se colocó en 9 ml de solución salina estéril al 0.85% de NaCl, esta dilución fue agitada a 120 rpm por 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, de las cuales se tomaron 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-4}$  hasta  $10^{-6}$  (Figura 8) y fueron sembradas en medio de cultivo sólido King B (Anexo 1). Las cajas Petri fueron selladas herméticamente, etiquetadas e incubadas a 30 °C por un periodo de 24 horas para el conteo de UFC.



**Figura 8.** Siembra de cepas: a) Diluciones seriadas. b) Siembra de muestra.

- b) Procesamiento de muestras para el aislamiento de *Azospirillum* sp.: De la muestra del suelo rizosférico del cultivo de maíz, se pesó 1 g de suelo y se colocó en 9 ml de solución salina estéril al 0.85% de NaCl, esta dilución fue agitada a 120 rpm por 15 minutos hasta obtener una mezcla homogénea. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril, de las cuales se tomaron 100  $\mu$ l de las diluciones  $10^{-4}$  hasta  $10^{-6}$  (Figura 9) y fueron sembradas en medio de cultivo sólido ácido málico-Agar-Rojo Congo B (Anexo 1). Las cajas Petri fueron selladas herméticamente, etiquetadas e incubadas a 30 °C por un periodo de 24 horas para el conteo de UFC.



**Figura 9.** Siembra de cepas a) Diluciones seriadas. b) Dispersión de muestra.

## 2. Longitud de raíz

Para la longitud de la raíz se tomaron 5 plantas al azar por tratamiento en cada repetición a los 80 días después de la siembra, separando la parte aérea de la raíz (Figura 10). Se midió desde la base del tallo hasta la parte apical de la raíz más larga. La medición se ejecutó con una cinta métrica. El resultado final es el promedio de las mediciones, las que fueron registradas en centímetros.



**Figura 10.** Longitud de raíz: a) División del área radicular y foliar. b) Medición de longitud radicular.

### 3. Peso seco de la raíz

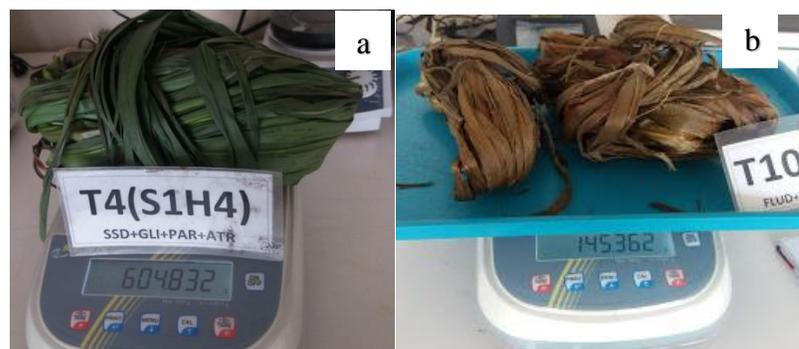
Se tomó el peso de 5 plantas al azar por tratamiento en cada repetición a los 80 días después de la siembra, siguiendo la metodología expuesta por Romero et al. (2017), las plantas fueron extraídas de las fundas y se separó la parte aérea de la radicular, luego las raíces se lavaron con abundante agua, eliminando los residuos de tierra presente. Luego fueron colocadas en fundas de papel con su respectiva etiqueta y llevadas al laboratorio del Programa de Maíz de la EESC, donde fueron secadas en una estufa a 65 °C durante 15 días (Figura 11). Transcurrido el tiempo se tomaron las muestras y se colocaron a temperatura ambiente para ser pesadas en una balanza analítica. Los valores se registraron en gramos. El resultado corresponde a la suma de los valores observados en cada tratamiento.



*Figura 11.* Peso seco de raíz: a) Extracción de plantas. b) Lavado de raíces. c) Peso fresco de raíz.

### 4. Peso seco foliar

A los 80 días después de la siembra, se tomaron 5 plantas al azar por tratamiento en cada repetición. Se pesó la parte aérea de la planta (fresco). Luego estas muestras fueron empacadas en bolsas de papel e introducidas en una estufa a 65 °C durante 15 días para obtener su peso seco (Figura 12). Los valores se registraron en gramos.



*Figura 12.* Peso foliar: a) Peso fresco foliar. b) Peso seco foliar.

### 3.3.2.8 Manejo específico del experimento

El procedimiento que se empleó en el experimento se detalla a continuación

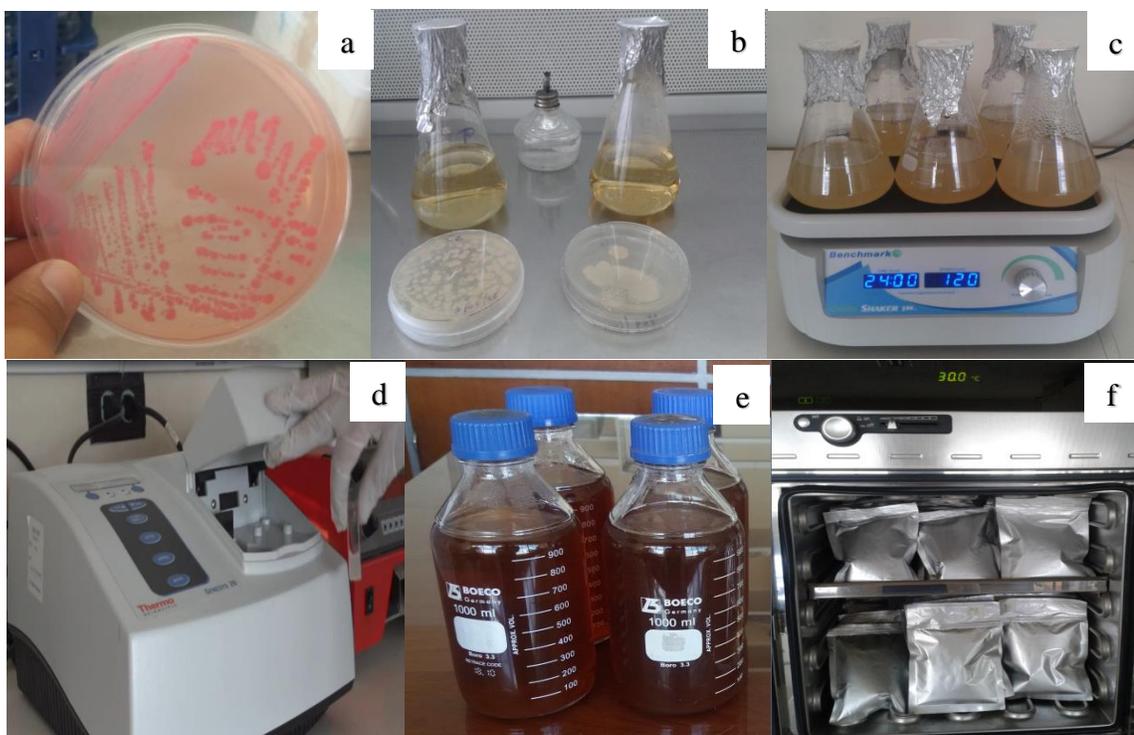
- **Elaboración del biofertilizante:** Para elaborar el biofertilizante se procedió a la reactivación de las cepas de *Azospirillum* sp. C2 y *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5 el cual consiste en el siguiente procedimiento:

Se colocó 1000 micro litros ( $\mu$ l), de peptona al 1%, en los tubos eppendorf que contienen las cepas liofilizadas, agitándose hasta homogenizar la mezcla con la ayuda del vortex. A continuación, se tomó 50  $\mu$ l de la cepa y se colocó en cajas Petri con medio sólido Ácido Málico – Rojo Congo para el caso de (*Azospirillum* sp), y King B para (*Pseudomonas fluorescens*), con una espátula de Digralsky se dispersó hasta que se seque. Finalmente se incubó a una temperatura de 30 °C por 7 días.

Luego se realizó el repique para el cual se tomó secciones puras, de la bacteria con un haza de platino para colocarlas en cajas Petri con medio Ácido Málico – Rojo Congo sólido para (*Azospirillum* sp.) y medio King B para (*Pseudomonas fluorescens*), estas fueron incubadas por 7 días a 30 °C.

Luego se seleccionó varias colonias y se transfirieron secciones de la bacteria pura con un asa de platino a un matraz de 250 ml, que contenía 150 ml de caldo nutritivo. Las cepas se propagaron en agitación rotatoria a 120 rpm a una temperatura de 30 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo en un espectrofotómetro se midió la densidad celular, para lo cual con una pipeta estéril se tomó 10 ml de cada propagación bacteriana y se vertió en una celda del espectrofotómetro.

Las muestras se sometieron a 540 nm y se obtuvo un valor de 1, el cual, indica que la muestra contiene aproximadamente  $1 \times 10^9$  UFC/ml. Luego se elaboró el inoculante líquido (biofertilizante), a base de melaza al 2% y la concentración bacteriana de  $1 \times 10^9$  UFC/ml, posteriormente fueron incubadas a 30 °C por 72 horas (Figura 13).



**Figura 13.** Elaboración del biofertilizante a) Reactivación de cepas bacterianas. b) Siembra en caldo nutritivo. c) Multiplicación de bacterias en agitación rotatoria. d) Medición de concentración en el espectrofotómetro. e) Elaboración del inoculante líquido. f) Incubación del biofertilizante.

- **Preparación del sustrato:** El sustrato fue elaborado a base de turba y tierra negra en proporciones 1:1(Figura 14), el cual fue esterilizado a una temperatura de 121 °C y 1 atm por una hora. Luego se realizó un análisis de nutrientes, se tomó una muestra de suelo estéril, el que se envió al Departamento de Manejo de Suelos y Aguas de la EESC-INIAP, para el respectivo análisis (Anexo 3).



**Figura 14.** Mezcla del sustrato.

- **Desinfección de la semilla:** Se utilizaron semillas de maíz variedad INIAP-101, las cuales se sumergieron en alcohol potable al 96% durante un minuto, pasado el tiempo se desechó el alcohol y se agregó el hipoclorito de sodio al 6.5% por un minuto. Luego con agua destilada estéril, se realizaron 10 lavados. A continuación, se colocaron las semillas en papel toalla estéril para su respectivo secado. De acuerdo a los tratamientos las semillas se desinfectaron utilizando fludioxonil. Siguiendo las recomendaciones del fabricante (Figura 15).



*Figura 15.* Desinfección de semilla: a) Semillas en alcohol potable. b) Secado de semillas. c) Desinfección de semillas con fludioxonil.

- **Inoculación de la semilla:** Se colocó 1kg de semilla de maíz variedad INIAP-101 dentro de un recipiente plástico. Posteriormente se agregó el biofertilizante, el cual se mezcló hasta que este se adhirió totalmente a la semilla (Figura 16), durante dos horas mostrando un color oscuro homogéneo.



*Figura 16.* Inoculación de semilla con el biofertilizante.

- **Siembra de semilla en las macetas:** La siembra se realizó manualmente, inmediatamente después de la inoculación de la semilla, depositando dos semillas de maíz por maceta (Figura 17). A los 15 días posteriores a la siembra se hizo el respectivo raleo obteniendo una planta por maceta.



**Figura 17.** Manejo del cultivo a) Siembra de maíz. b) Raleo de plantas.

- Aplicación del herbicida:** El herbicida fue aplicado mediante pulverización en base a las recomendaciones del producto (Figura 18). Se utilizaron 0.006 ml de glifosato en 0.4 ml de agua destilada por funda, que corresponde a una dosis comercial de 3 l ha<sup>-1</sup>, que fueron aplicados 15 días antes de la siembra. Paraquat se aplicó 8 días antes de la siembra con una dosis de 0.006 ml en 0.4 ml de agua destilada por funda, que corresponde a una dosis comercial de 3 l ha<sup>-1</sup> y atrazina se aplicó 15 días después de la siembra con una dosis de 0.004 g en 0.4 ml de agua destilada por funda, que corresponde a una dosis comercial de 2 kg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 18.** Uso de herbicida a) Preparación del herbicida. b) Aplicación pre-emergente (glifosato; paraquat). c) Aplicación post-emergente (atrazina)

- Riego:** El riego se realizó de acuerdo a las necesidades del cultivo, hasta que este alcanzó la capacidad de campo, adicionalmente se realizó un riego por aspersión durante 10 min cada día para mantener la humedad dentro del invernadero (Figura 19).



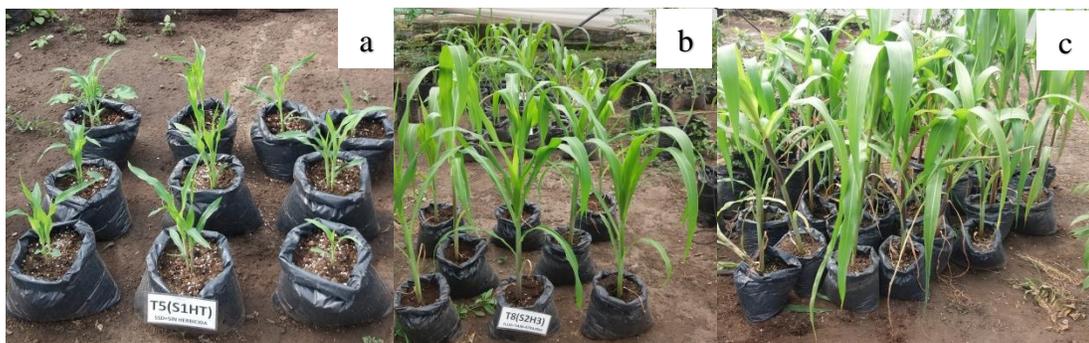
**Figura 19.** Riego de plantas a) Riego manual. b) Riego por aspersión

- **Fertilización:** De acuerdo a Yáñez, Clavijo y Cool (2015), para el uso del biofertilizante se aplicará el 50% de la fertilización recomendada a base de N, P y K. Sin embargo, basándose en el análisis químico del suelo entregado por el Departamento de Manejo de Suelos y Aguas del INIAP, se tomó la decisión de no realizar fertilización inicial, debido al contenido alto de nutrientes en el sustrato. Pero a los 26 días después de la siembra se aplicó la solución Steiner<sup>3</sup> (Figura 20), con el fin de suplementar los nutrientes requeridos por la planta para el adecuado crecimiento y desarrollo del cultivo.



*Figura 20.* Solución Steiner.

- **Control de plagas:** Se realizó el monitoreo seleccionando cinco plantas al azar por bloque. Por cada planta se determinó la presencia o ausencia de enfermedades y patógenos dañinos durante la fase vegetativa (Figura 21). Durante esta investigación no fue necesario realizar el control químico debido a la ausencia de patógenos.



*Figura 21.* Plantas a las que se hizo el monitoreo en busca de plagas a) Plantas de 20 días. b) Plantas de 40 días. c) Plantas de 60 días (libres de plagas y enfermedades).

<sup>3</sup> Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 0.27 g l<sup>-1</sup>; KNO<sub>3</sub>: 0.37 g l<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>: 0.20 g l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.06 g l<sup>-1</sup> y micronutrientes: 0.01 g l<sup>-1</sup>

# CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación se realizó para comprender la respuesta de sobrevivencia, viabilidad y crecimiento de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a la aplicación de herbicidas en condiciones *in vitro* y campo. Los resultados se presentan de acuerdo a los experimentos realizados durante la investigación.

- Experimento I: *In vitro*
- Experimento II: Plantas de maíz bajo invernadero

### 4.1 Experimento I: *In vitro*

A continuación, se presentan los resultados del crecimiento de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula, frente a la exposición de herbicidas.

#### Crecimiento poblacional de bacterias

Se determinó la concentración inicial presentes en los medios de cultivo de bacterias de  $5.9 \times 10^8$  y  $1.2 \times 10^8$  UFC/ml de solución madre *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula respectivamente.

#### a) *Azospirillum* sp.

Una vez realizado el análisis de varianza (Tabla 12), respecto a la variable crecimiento poblacional de *Azospirillum* sp. se determinó que existe interacción entre tiempo y herbicida ( $F=22.14$ ; GL error=25;  $P= <0.0001$ ), estos resultados indican que el tipo de herbicida y tiempo de exposición conjuntamente influyeron significativamente sobre la viabilidad de la cepa.

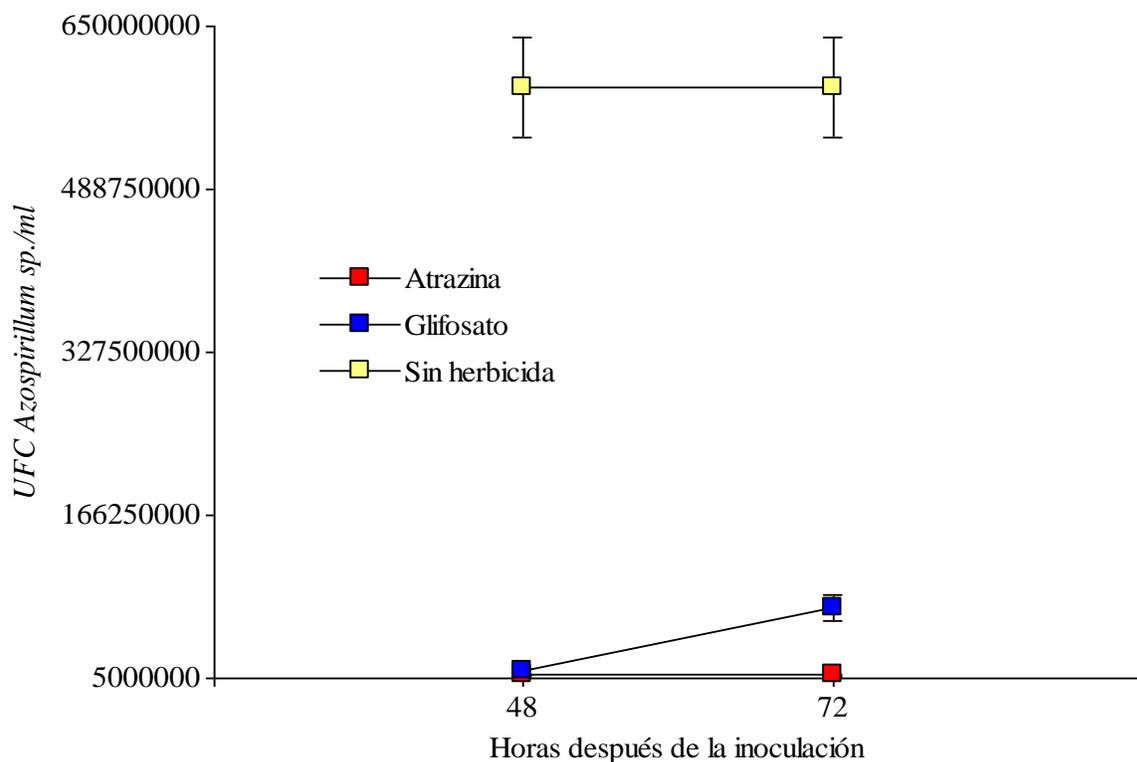
**Tabla 12.**

*ADEVA del Efecto de herbicidas sobre el crecimiento poblacional de Azospirillum sp.*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Tiempo	1	25	22.14	0.0001
Herbicida	2	25	367.87	<0.0001
Tiempo: herbicida	2	25	22.14	<0.0001

*Azospirillum* sp. muestra una capacidad intrascendente de crecimiento en el medio Rojo congo con glifosato y atrazina por separado, presentando a las 48 horas una disminución significativa en la concentración celular respecto al cultivo inicial ( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ), glifosato:  $6 \times 10^6$  y atrazina:  $7 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , que concierne al 98 y 99% de descenso frente al control (sin herbicida en el medio de cultivo). En lo que compete a las 72 horas después de la inoculación, en el medio con atrazina el crecimiento de la población bacteriana se mantiene; mientras, que con glifosato incrementó hasta el orden de  $5 \times 10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , que corresponde al 13% en relación al control. Estas características se ilustran en la figura 22.

Estos resultados sugieren que las dosis comerciales de glifosato y atrazina en el medio limitan el crecimiento bacteriano; pero, esto no afecta la capacidad solubilizadora de fósforo (P). En este sentido Hernández et al. (2018), afirmaron que la presencia de glifosato no afecta el número de bacterias que respondan una eficiente solubilización de P, cuando el orden se mantiene  $10^7$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ .



**Figura 22.** Crecimiento poblacional de *Azospirillum* sp.<sup>4</sup> *in vitro*.

<sup>4</sup> Concentración inicial:  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$

Resultados similares obtuvieron Hernández, Covacevich, Aparicio y De Gerónimo (2018), quienes evidenciaron un 30% de disminución de la concentración inicial de *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner a las 72 horas, frente a la aplicación de glifosato. Por otra parte, Madhaiyan, Poonguzhali, Hari, Saravanan y Sa (2006), estudiaron la aplicación de atrazina sobre el crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Cavalcante y Dobereiner demostrando una afinidad positiva que no afectó la viabilidad de la bacteria, a pesar de ello, al añadir cantidades superiores a la comercial la población expresó una inhibición del 50% de las células con 22 mg l<sup>-1</sup>.

Sin embargo, el impacto negativo de crecimiento bacteriano es especialmente dramático en presencia de paraquat debido a que este fue nulo (figura 23). En este aspecto Procópio et al. (2006), discrepan ya que en el medio DIGs obtuvo un 30% menos de biomasa de *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner frente al control, afectando su capacidad de fijación biológica de nitrógeno al 50% en dosis de 1 g ha<sup>-1</sup>.

#### **b) *Pseudomonas fluorescens* Migula**

Una vez realizado el análisis de varianza (Tabla 13), se determinó que existe un efecto individual de los herbicidas aplicados, sobre el crecimiento poblacional (F=84.33; GL error=15; P=<0.0001). El tipo de herbicida influye directamente sobre la viabilidad de la cepa.

**Tabla 13**

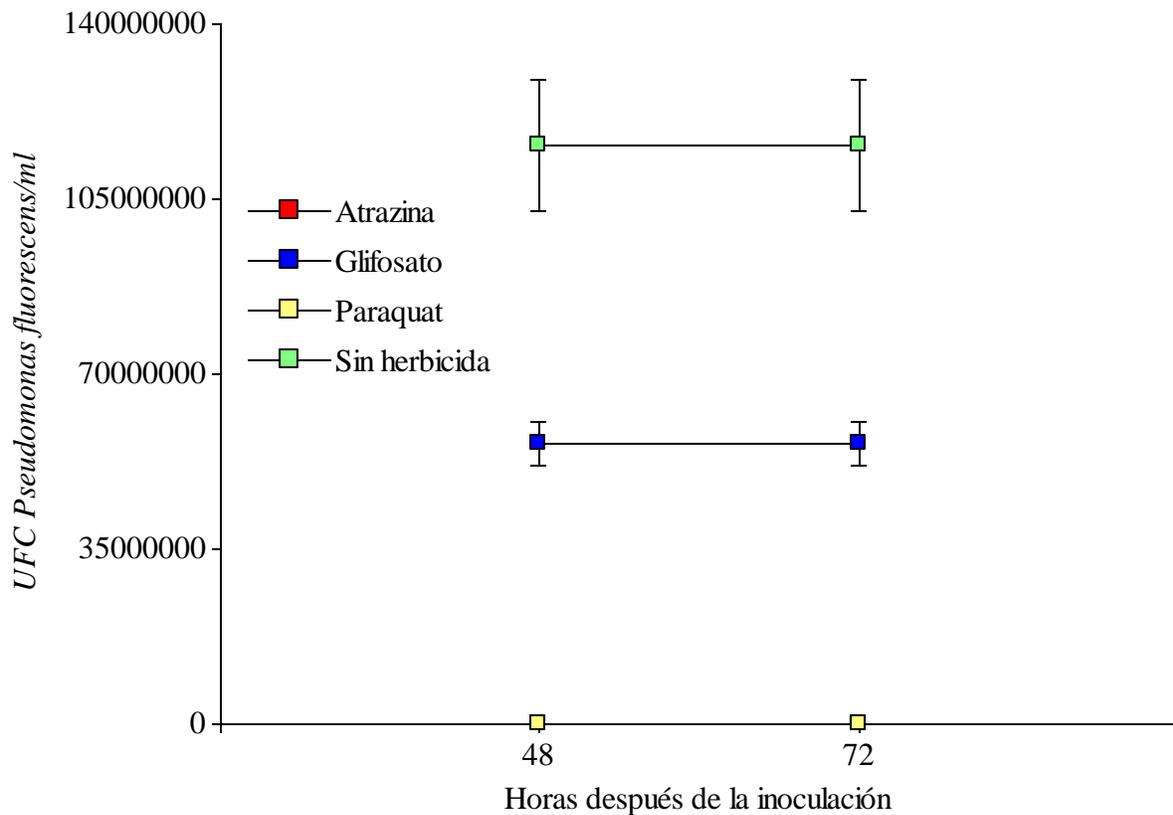
*ADEVA del efecto de herbicidas sobre el crecimiento poblacional de Pseudomonas fluorescens*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Tiempo	1	15	0.00	>0.9999
Herbicida	1	15	84.33	<0.0001
Tiempo: herbicida	1	15	0.00	>0.9999

El comportamiento de *Pseudomonas fluorescens* Migula frente a la aplicación de herbicidas se estableció a partir del crecimiento bacteriano, en condiciones *in-vitro*. Cuando el herbicida presente en el medio es glifosato, disminuye un 51% la concentración celular alcanzada por el control en el tiempo de 48 y 72 horas, como se observa en la figura 23. Estudios realizados por

Martínez-Nieto, Bernal-Castillo, Agudelo-Fonseca y Bernier-López (2012), manifiestan que las bacterias del género *Pseudomonas* spp. prefieren compuestos hidrofílicos como el glifosato utilizándolo como única fuente de carbono, el crecimiento de este aislado es mejor cuando se realiza en consorcios con *Pseudomonas aeuriginosa*, ya que actúan benéficamente entre sí para tolerar altas concentraciones (20 y 30%), de glifosato y metabolizarlos.

No obstante, en los medios que se añadieron atrazina y paraquat el crecimiento fue nulo, mostrando mayor sensibilidad a estos ya que generan un efecto tóxico en la cepa (Figura 23). Esto se debe a que el principio activo y funcionalidad que tienen los herbicidas para inhibir el crecimiento de plantas no deseadas afectan el metabolismo de microorganismos (Benito et al., 2018).



**Figura 23.** Crecimiento poblacional de *Pseudomonas fluorescens* Migula<sup>5</sup> in vitro.

<sup>5</sup> Concentración inicial:  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>

En el caso de ambas bacterias, el contacto de cepas y los herbicidas es muy estrecho en condiciones *in-vitro* provocando un estrés el cual evidencia drásticas disminuciones de la biomasa bacteriana en relación a su concentración inicial, respecto a esto Santos et al. (2005), señalan que en condiciones de estrés, parte de la energía disponible para el organismo se gasta en mantener los mecanismos celulares y bioquímicos específicos relacionados con la tolerancia de herbicidas a expensas del crecimiento, reduciendo el coeficiente del rendimiento microbiano.

Parte del estrés al que se someten estas bacterias al estar en contacto con el herbicida es el descenso del pH en rangos inferiores a 5 en el medio de cultivo frente a esto Romero-Perdomo, Camelo-Rusinque, Criollo-Campos y Bonilla-Buitrago (2015), cuantificaron valores de biomasa por debajo de una y tres unidades logarítmicas en pH de 5.5 y 7.5, estos pH afectaron el metabolismo y la velocidad de crecimiento, además indican que la temperatura y el pH influyen significativamente en la viabilidad de las bacterias, la mayor abundancia de aislados fueron obtenidos a los 30 °C, a un pH entre 6 a 7.8.

La estructura de las comunidades microbianas es influenciada por el pH y las condiciones nutricionales del medio, presentando una disminución poblacional de bacterias al estar sometidas a pH inferiores (Sangoquiza, Viera y Yáñez, 2018). La sobrevivencia de *Pseudomonas fluorescens* Migula está limitada a la baja permeabilidad de la célula bacteriana a pH del medio, mecanismos de sorción y la disponibilidad de P inorgánico (Martínez-Nieto et al., 2012).

Al incorporar sustancias al medio de crecimiento se afectó notoriamente la viabilidad y desarrollo de estas bacterias, manifestando una respuesta inferior en el UFC de *Azospirillum* sp./ml y UFC de *Pseudomonas fluorescens* /ml. Esta disminución pudo deberse a modificaciones en el pH, color y otras reacciones químicas que ocurren al añadir nuevos compuestos químicos en el medio de cultivo, donde se desarrolla y viven estas cepas.

#### **4.2 Experimento II: Plantas de maíz bajo invernadero**

El experimento permitió evidenciar la respuesta de la viabilidad celular de un inoculante, con base en cepas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula, ante el uso del fungicida Fludioxonil y herbicidas. A continuación, se detallan los resultados hallados durante el segundo experimento.

#### 4.2.1 Colonización de bacterias

Para conocer la colonización de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula se tomó una muestra de la rizósfera del cultivo de maíz a los 20, 40, 60 y 80 días después de la siembra, estas fueron llevadas al laboratorio del Programa de Maíz de la EESC. Se aplicó la técnica de recuento directo en placa de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g de suelo).

##### a) *Azospirillum* sp.

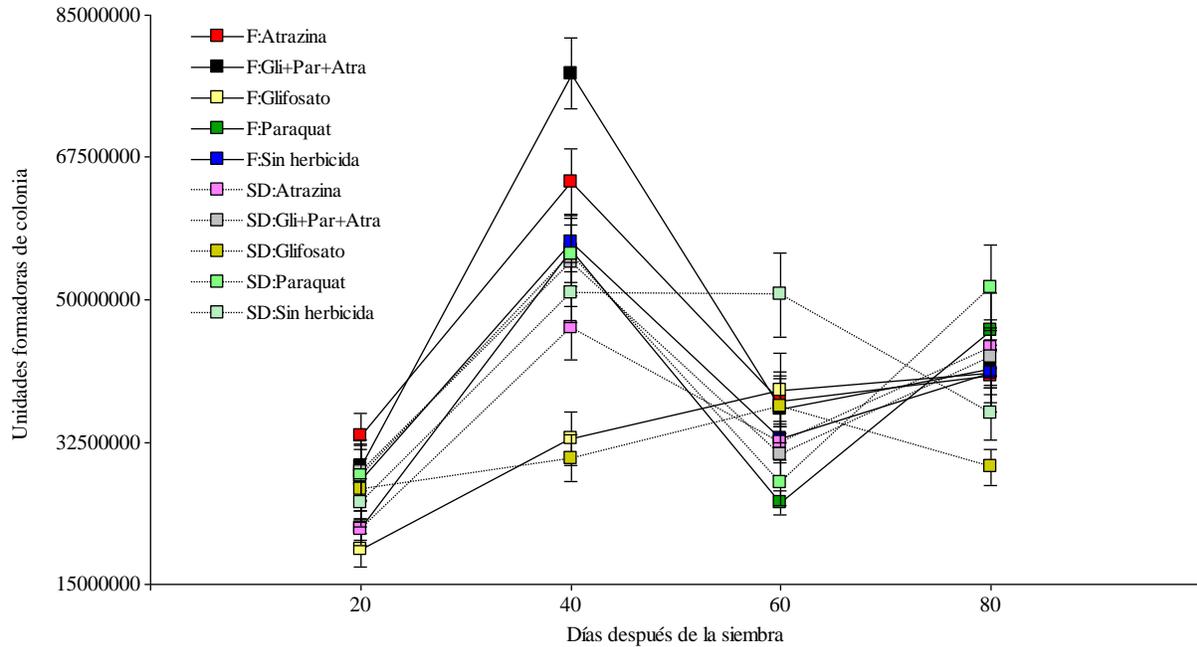
El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre la interacción (días, desinfección y herbicidas), (F= 2.38; GI=12,678; P= 0.0053). La acción mutua entre los factores, influye directamente sobre la viabilidad de las células de *Azospirillum* sp. (Tabla 14).

**Tabla 14**

*Análisis de varianza para población de Azospirillum sp. presentes en la rizósfera de maíz variedad INIAP-101.*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Días	3	678	100.99	<0.0001
Desinfección	1	678	3.39	0.062
Herbicida	4	678	10.70	<0.0001
Días: desinfección	3	678	2.49	0.0589
Días: herbicida	12	678	6.60	<0.0001
Desinfección: herbicida	4	678	3.15	0.0141
Días: desinfección: herbicidas	12	678	2.38	0.0053

Los resultados revelaron que el tipo de desinfección a las semillas y la aplicación de herbicidas que comprenden en su totalidad los tratamientos evaluados, causan un efecto negativo sobre la supervivencia de *Azospirillum* sp., debido a que se manifestó una drástica disminución de  $10^9$  UFC/ml en el día de la inoculación a  $10^7$  UFC/ gramo de rizósfera a partir de los 20 días posteriores a la siembra; mismo orden que se mantuvo durante el resto del ensayo (Figura 24).



**Figura 24.** Colonización radicular de la cepa *Azospirillum* sp. C2<sup>6</sup>

Existe un efecto homólogo entre los tratamientos, expresando un número poco variable de bacterias con una tendencia regresiva frente a la inoculación. Resultados similares encontraron Romero-Perdomo, Camelo y Bonilla (2015), quienes observaron una disminución progresiva (2 unidades logarítmicas), de *Bradyrhizobium japonicum* frente a la aplicación de fludioxonil, generando un 26% de pérdida celular; de la misma forma García et al (2012), mostraron que al estar expuesto *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner al tratamiento químico con fungicidas (fludioxonil), se afectó considerablemente la supervivencia.

Frente a esto, Pereira et al. (2020), señalan que el reconocimiento mutuo entre microorganismo está dado por la capacidad de los pesticidas de alterar el metabolismo secundario de microorganismos, lo que influye directa o indirectamente sobre el número las bacterias. Procopio et al. (2011), comprobaron que el contacto entre *A. brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner y los herbicidas MSMA y paraquat es compatible, pese a que reducen la tasa de crecimiento, de la misma forma Santos, Rondina, Nogueira y Hungria (2020), observaron la respuesta a la adición de herbicidas al suelo por parte de las bacterias provocó incrementos en la tasa respiratoria por unidad de biomasa microbiana y la disminución de células viables.

<sup>6</sup> Concentración inicial:  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>

Por otra parte, García et al. (2012), estudiaron la combinación del biofertilizante a base *Azospirillum brasilens* Tarrand, Krieg et döbereiner con la fertilización nitrogenada (amonio anhídrido), en el cultivo de maíz; los resultados de esta investigación demuestra una reducción de la inoculación inicial de  $10^7$  UFC a  $10^5$ - $10^6$  UFC  $g^{-1}$  en suelo y  $10^4$ - $10^5$  UFC  $g^{-1}$  en rizósfera, mientras que en tejidos se detectaron entre  $10^3$ - $10^4$  UFC  $g^{-1}$ , además señala que la concentración óptima de esta cepa bacteriana para establecer una interacción planta microorganismo efectiva es de aproximadamente de  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  suelo datos que concuerdan con los hallados en esta investigación, lo que permite el uso de la cepa bacteriana acompañada con los pesticidas estudiados en campo, sin afectar la capacidad de actuar como BPCV.

### b) *Pseudomonas fluorescens* Migula

Los resultados de la Tabla 15 indicaron que la interacción de días, desinfección y herbicidas afectaron significativamente ( $F= 3.54$ ;  $GI=12,678$ ;  $P= 0.0207$ ), sobre el crecimiento poblacional de *Pseudomonas fluorescens* Migula. Es decir que la viabilidad de la cepa bacteriana está relacionada a la acción en conjunto de los factores.

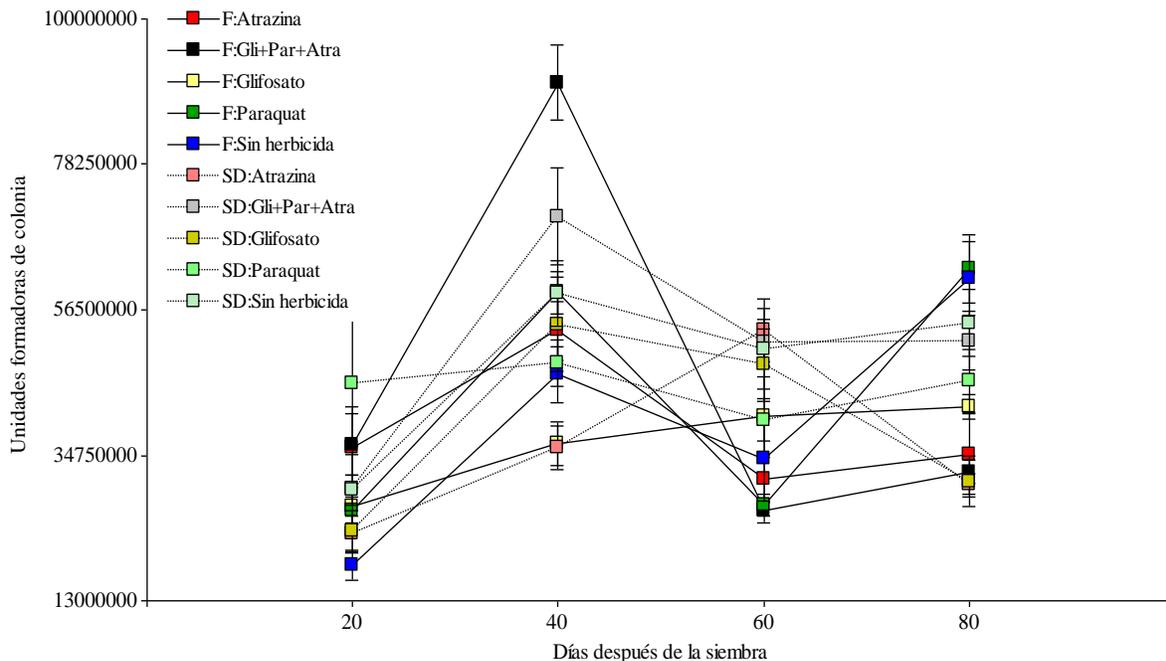
**Tabla 15**

*Análisis de varianza para población de Pseudomonas fluorescens Migula presentes en la rizósfera de maíz variedad INIAP-101.*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Días	3	678	65.03	<0.0001
Desinfección	1	678	5.37	0.0207
Herbicida	4	678	6.70	<0.0001
Días: desinfección	3	678	11.13	<0.0001
Días: herbicida	12	678	4.53	<0.0001
Desinfección: herbicida	4	678	2.20	0.0679
Días: desinfección: herbicidas	12	678	3.54	<0.0001

Existe la ausencia de efectos estadísticos significativos entre la interacción del tipo de desinfección y el herbicida aplicado; sin embargo cuando interactúa la cepas de *Pseudomonas fluorescens* Migula con el fungicida fludioxonil, los herbicidas y el tiempo esto conlleva a tener

diferencias estadísticas significativas de crecimiento poblacional (Figura 25), además, viéndose afectada la viabilidad de *Pseudomonas fluorescens* Migula disminuyendo de la concentración inicial de  $10^9$  UFC/ml a  $10^7$  UFC/g de rizósfera, específicamente a los 20 días y resto del ensayo, se cuantifica pérdidas de 2 unidades logarítmicas de biomasa.



**Figura 25.** Colonización radicular de la cepa *Pseudomonas fluorescens* Migula NI5<sup>7</sup>

De la misma forma Alexandrino, Mucha, Almeida y Carvalho (2020), encontraron en suelos de uso agrícola, 9 géneros de rizobacterias dentro de estos identificaron algunos que se encuentran en consorcios microbianos específicos: *Pseudomonas fluorescens* Migula, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Rhodobacter* sp., *Azospirillum thiophilum* Lavrinenko et al, *Methylobacillus* sp. y *Pannonibacter phragmitetus* Borsodi et al, a partir de esto evaluó la capacidad para degradar fludioxonil, lo que se consiguió a los 105 días, demostrando la capacidades positivas del uso de esta cepa como biorremediadores del ambiente.

Kurhade, Gade y Kshirsagar (2019), estudiaron el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* Migula en suelos modificados con plaguicidas a diferentes intervalos de tiempo, manifestando una disminución poblacional a los 30 días, mientras que a los 60 días con la adición de la

<sup>7</sup> Concentración inicial:  $10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>

bacteria a una dosis 10 g kg<sup>-1</sup> de suelo y 15 g kg<sup>-1</sup> de suelo aumentó el crecimiento de biomasa celular.

Por otra parte, las semillas de maíz presentaron un 98 % de germinación expresando que el uso del inoculante en conjunto con el fungicida no afectó la viabilidad de la semilla, datos que concuerdan con los encontrados por Mariucci et al. (2018), quienes demostraron que la adición de inoculantes no afecta la calidad de semillas de maíz durante 90 días. Estos resultados demuestran el potencial de las bacterias para adaptarse al estrés ocasionado por los pesticidas y promover el desarrollo del cultivo.

### **Variables agronómicas**

Se detectó variación en la respuesta de las plantas de maíz a la inoculación de las cepas. Los resultados de antagonismo en campo indicaron que las cepas de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula presentes en el biofertilizante con el uso de fungicida (fludioxonil) y herbicidas (glifosato, paraquat y atarzina), produjeron una interacción con la planta a través de los exudados radicales. Los resultados de las variables longitud de raíz, peso seco de raíz y materia seca foliar se cuantificó al final del ensayo (80 días después de la siembra).

#### **4.2.2 Longitud de raíz**

Los resultados mostraron que los factores actúan por separado, hallando diferencias significativas de la desinfección a la semilla (F=5.31; gl=1, 138; P=0.0227) y los diferentes herbicidas (F=7.08; gl=4, 138; P=<0.001), sobre la longitud radical de las plantas de maíz (Tabla 16).

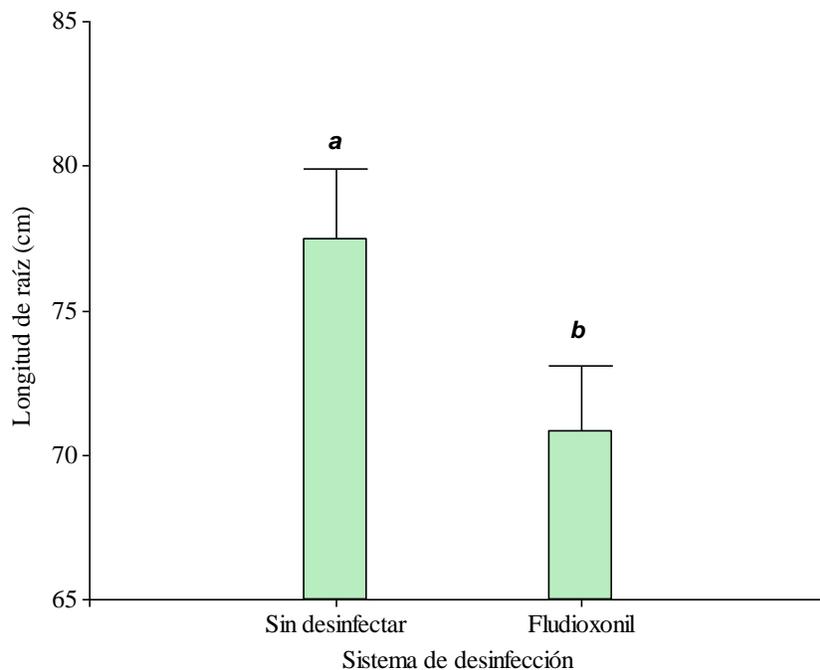
**Tabla 16**

*Análisis de varianza sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre la longitud de raíz del cultivo de maíz*

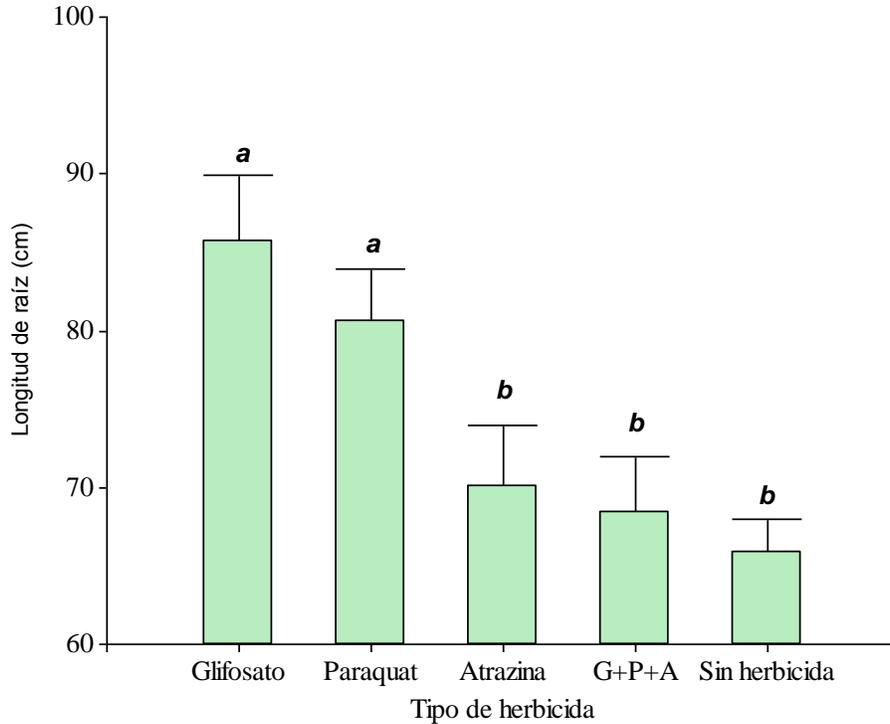
Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Desinfección	1	138	5.31	0.0227
Herbicida	4	138	7.08	<0.0001
Desinfección: herbicida	4	138	1.70	0.1528

Las plantas de maíz sin desinfectar fueron superiores en un 8.57% a los obtenidos con fludioxonil (Figura 26). Los resultados revelaron que la longitud radical máxima del cultivo (77.47 cm) se encontró para los tratamientos sin desinfectar, mientras que la longitud mínima (70.83 cm) se observó en los tratamientos con fludioxonil.

En lo que respecta a la interacción entre herbicidas y plantas de maíz, la longitud de raíz más alta de 85.73 cm se registró para glifosato más el inoculante y la longitud mínima radicular de 65.90 cm se registró en el control sin herbicida más el inoculante (Figura 27). En los resultados antes mencionados, se puede apreciar que los tratamientos con aplicación de herbicidas si influyeron en la longitud de raíz, ya que muestran superioridad de elongación radicular con el tratamiento aplicado glifosato con una media de 85.73 cm siendo superior en un 5.94%, 18.31%, 20.17% y 23.13% a paraquat, atrazina, la combinación de herbicidas (glifosato, paraquat y atrazina) y el control respectivamente



**Figura 26.** Longitud radicular de acuerdo al tipo de desinfección



**Figura 27.** Longitud radicular de acuerdo al tipo de herbicida

Pincay (2019), obtuvo valores entre 28 y 60 cm de longitud de la raíz en plantas de maíz inoculadas con *Pseudomonas* sp., lo que evidenció el efecto benéfico de la rizobacterias sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Resultados similares encontró Sangoquiza (2017), quien demostró valores más altos con respecto a la longitud de la raíz en los tratamientos con la simple inoculación de *Azospirillum* sp. (38.67 cm) y su combinación con la *Pseudomonas fluorescens* Migula (37 cm), tratamientos que no difirieron significativamente del control de referencia (con fertilización mineral, N y P) que tuvo un valor de 31cm. Sin embargo, durante el presente estudio el factor que afectó a la longitud radicular fue el estrés causado a las plantas con la adición de pesticidas que pueden reducir la eficiencia del sistema radicular en adquirir los nutrientes para el buen desarrollo y crecimiento de la planta.

Estos estudios concuerdan con Santos et al. (2020), ya que observaron que existe una disminución de la biomasa radicular al aplicar el fungicida fludioxonil metalaxyl con y sin inoculación, además indica que el uso de la inoculación con *A. brasilense* Tarrand, Krieg et döbereiner ayudó a mitigar los efectos tóxicos causados por el pesticida en volumen de la raíz y peso seco de la raíz. Los resultados obtenidos, difieren del trabajo realizado por Rangel-Lucio et

al. (2011), quienes observaron que la inoculación de las cepas de *Azospirillum* disminuyó significativamente el volumen de la raíz de las variedades de maíz, lo que representó una reducción entre 38 a 45%.

Díaz, Castillo, Ortiz y Espinosa (2019), explican que la combinación del insecticida-fungicida Crusier-Maxxy los micro elementos Fe más Zn, en tratamiento a semillas de sorgo (*Sorghum* spp.), maíz (*Zea mays* L.), soya (*Glycine max* L.) y algodón (*Gossypium herbaceum* L.), no tuvieron impacto significativo en cuanto a la biomasa fresca y seca radicular; por lo tanto, el uso de fungicidas permite tener un control en las semillas para prevenir enfermedades y obtener un cultivo vigoroso.

#### 4.2.3 Peso seco de raíz

El análisis de varianza sobre la variable peso seco de raíz muestra que existe diferencias estadísticamente significativas interacción entre la desinfección y los herbicidas ( $F= 3.53$ ;  $GI= 4,18$ ;  $P= 0.0271$ ), lo cual indica que la desinfección de semilla y la aplicación de herbicidas influyeron directamente en el peso seco de raíz (Tabla 17).

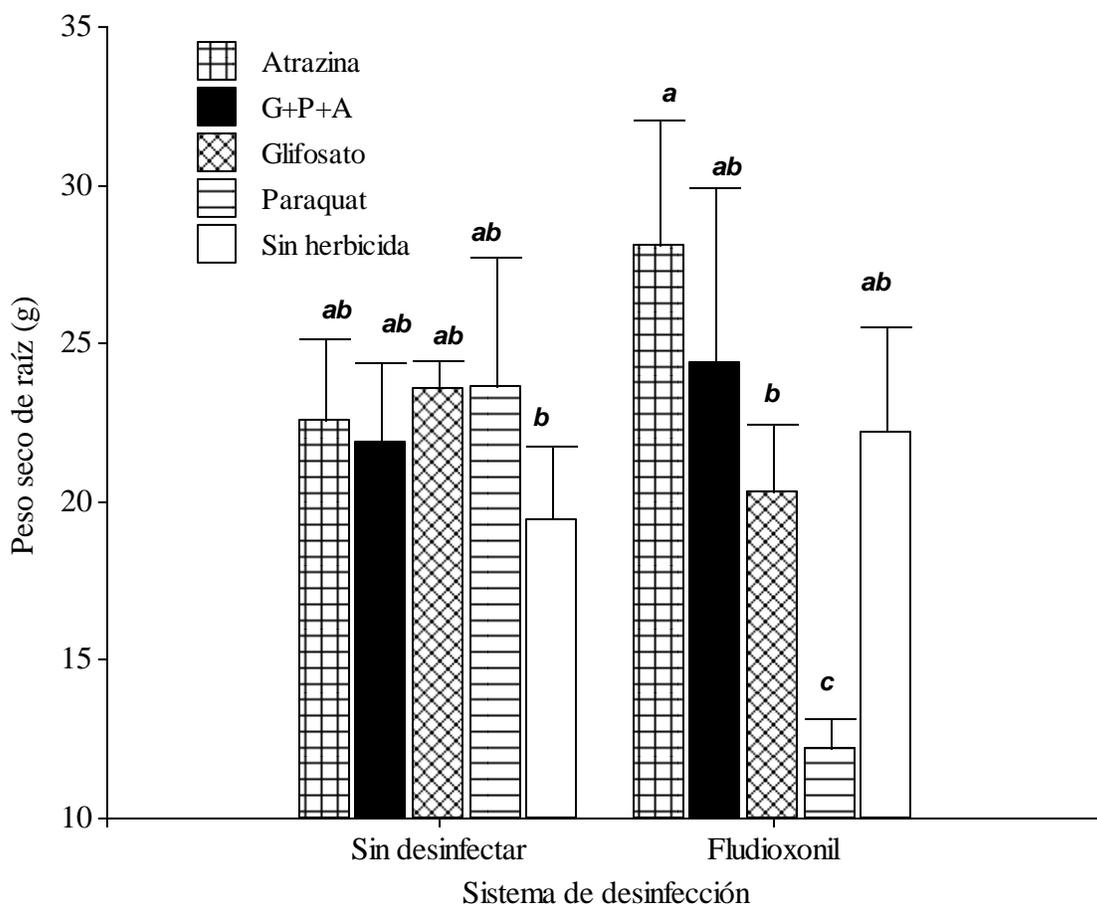
**Tabla 17**

*Análisis de varianza sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre peso seco de raíz del cultivo de maíz*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Desinfección	1	18	3.31	0.0854
Herbicida	4	18	2.28	0.1010
Desinfección: herbicida	4	18	3.53	0.0271

Al cabo de 80 días después de la siembra, el efecto de la inoculación de las suspensiones bacterianas sobre las semillas de maíz en condiciones bajo invernadero conjuntamente con los tratamientos de desinfección y aplicación de herbicidas, arrojó como resultado para la variable peso seco de raíz, cuatro rangos de significancia, el primero integrado únicamente por el tratamiento T8 (Fludioxonil más atrazina), causó el mayor peso seco de raíz con 28.12 gramos como media para las 3 repeticiones. En cambio, el segundo rango está constituido por los tratamientos que en su mayoría corresponden a los tratamientos sin desinfectar: T1 (Sin

desinfectar más glifosato); T2 (Sin desinfectar más paraquat); T3 (Sin desinfectar más atrazina); T4 (Sin desinfectar más la combinación de glifosato, paraquat y atrazina); T9 (fludioxonil más la combinación de glifosato, paraquat y atrazina) y T10 (fludioxonil sin herbicida); el tercer rango está formado por los tratamientos T5 (Sin desinfección y sin herbicida) y T6 (fludioxonil más glifosato). Mientras que el tratamiento que se ubica en el último rango con una media de 12.21 g en el peso seco de raíz, es el T7 (fludioxonil más paraquat) con un descenso del 56.57% frente al rango con mayor peso, como se observa en la (figura 28), de igual forma hay que recalcar que el control solo fue superior frente al T7.



**Figura 28.** Peso seco de raíz

El efecto de la biofertilización a base de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula sobre los contenidos de materia seca de la raíz del maíz variedad “INIAP-101” establecidas en condiciones de invernadero a los 80 días. Como se puede observar los tratamientos sin desinfectar no mostraron diferencias significativas entre sí. No obstante, este comportamiento

difiere con los tratamientos desinfectados la semilla con fludioxonil donde se observó en la producción de materia seca raíz, existiendo diferencias significativas entre estos. Estos resultados están influenciados por el efecto de las cepas inoculadas en la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal como el ácido indolacético (AIA) y la solubilización del fósforo donde se observa frecuentemente un mayor desarrollo radical, que se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, que provoca elongación radicular y mayor biomasa.

Respecto a lo anterior, Cortés-Patiño, Vesga-Ayala, Sigarroa-Rieche, Moreno-Rozo y Cárdenas-Caro (2015), obtuvieron resultados benéficos al obtener un porcentaje superior al testigo frente en biomasa de radicular en plantas de cacao inoculadas con *Azospirillum*, lo que evidenció el efecto benéfico de la rizobacterias sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Gutiérrez et al. (2008), demostraron que al medir el efecto del factor de estudio aplicación de diferentes herbicidas, el análisis de la varianza determinó efectos significativos sobre peso de raíces totales de *Manihot esculenta* Crantz que fue analizada a los 270 días después de la siembra donde el mayor peso de raíces totales fue alcanzado por el tratamiento oxifluorfen, seguido de los tratamientos linuron + alaclor, ametrina + atrazina, ametrina + atrazina + alaclor siendo superiores al testigo (27.33 kg.ha<sup>-1</sup>).

Por otra parte, Santos et al. (2020) mencionan que si existe disminución de la biomasa radicular al aplicar el fungicida fludioxonil metalaxyl con y sin inoculación, provocando efectos fitotóxicos sobre la biomasa radicular datos que concuerdan con la investigación realizada.

#### **4.2.4 Materia seca foliar**

Una vez realizado el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 18). Es decir que la materia seca foliar de maíz no depende de los factores en estudio (desinfección y herbicida). Según los resultados mostrados en la Tabla 24, no hubo efecto de la desinfección en combinación con los herbicidas en el crecimiento del cultivo; por lo tanto, el cultivo se desarrolló normalmente a las dosis aplicadas.

**Tabla 18**

*ADEVA Sobre el efecto de la desinfección a la semilla en conjunto con la aplicación de herbicidas sobre la longitud de raíz del cultivo de maíz*

Fuente de variación	Grados de libertad F.V	Grados de libertad Error	Valor-F	Valor-P
Desinfección	1	18	0.13	0.7195
Herbicida	4	18	0.46	0.7606
Desinfección: herbicida	4	18	1.62	0.2119

En la Tabla 19, se presenta el efecto de la inoculación a base de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens* Migula en conjunto con la desinfección y aplicación de herbicidas sobre los contenidos de materia seca foliar del maíz variedad “INIAP-101” establecidas en condiciones de invernadero a los 80 días. Como se puede observar existen tres rangos de significancia.

**Tabla 19**

*Efecto de los tratamientos sobre el peso seco de raíz del maíz variedad “iniap-101” a los 80 días de establecidas en condiciones de invernadero.*

No	Tratamientos	Peso seco foliar (g)
1	Sin desinfectar más glifosato	86.12 ab
2	Sin desinfectar más paraquat	101.28 ab
3	Sin desinfectar más atrazina	101.90 ab
4	Sin desinfectar más lifosato+paraquat+atrazina	104.34 ab
5	Sin desinfectar sin herbicida	86.03 ab
6	Fludioxonil más glifosato	112.64 a
7	Fludioxonil más paraquat	72.22 b
8	Fludioxonil más atrazina	105.13 ab
9	Fludioxonil más lifosato+paraquat+atrazina	94.16 ab
10	Fludioxonil sin herbicida	110.59 ab

Medias con letras distintas difieren significativamente según la prueba de Fisher ( $p < 0.05$ ).

El primer rango corresponde para el tratamiento T6 (fludioxonil más glifosato), este ocasionó el mayor peso seco foliar con una media de 112.64 g. El segundo rango está conformado por la mayoría de tratamientos (T1; T2; T3; T4; T5; T8; T9 y T10), que comparte medias con la misma letra (ab). Mientras que el tratamiento que se ubica en el último rango con una media de 72.22 g en el peso seco foliar, es el T7 (fludioxonil mas paraquat) con un descenso del 35.88% frente al rango con mayor peso, como se observa en la tabla 25, lo que indica la baja sensibilidad de este cultivo a la exposición de fungicidas y herbicidas en dosis recomendada por el producto.

Los resultados de Anzalone, Ruíz, Zambrano y Ortíz (2011), concuerdan con la investigación, ya que aplicaron herbicida (imazethapyr + imazapyr), en el suelo no encontrándose significancia sobre la biomasa foliar seca en el cultivo de maíz entre los tratamientos con dosis comerciales frente al control; sin embargo, mencionan que existe una disminución de la biomasa a medida que aumentó la dosis del herbicida en el suelo.

Resultados similares encontró Gutiérrez et al. (2008), quienes evaluaron el cultivo de yuca frente a la aplicación de herbicidas (atrazina +Ametrina; Oxifluorfen; Linurón y atrazina + Ametrina + alaclor), para el control de malezas, quienes demostraron que no existe diferencias significativas frente al control en la variable de altura de planta, que de alguna forma está relacionada a la biomasa foliar.

De hecho Tejada y Helfgott (2018), coinciden con la investigación ya que evaluaron la atrazina, pendimetalin y metribuzin en maíz amarillo duro sobre el número de mazorcas por planta donde no varió con el control, sin embargo, puede cambiar con el manejo de la densidad de siembra, observaron que los máximos rendimientos de grano se obtuvieron con el control manual, pendimetalin 1 000 g i.a. ha<sup>-1</sup> y atrazina 750 g i.a. ha<sup>-1</sup>, mientras que en relación al beneficio económico (\$ 1585.86 ha<sup>-1</sup> por campaña) se logró con la aplicación de 750 g i.a. ha<sup>-1</sup> de atrazina, seguido del control manual (\$ 1530.97 ha<sup>-1</sup> por campaña), lo cual demuestra el potencial del cultivo de maíz para ser aplicado en conjunto con herbicidas sin afectar su características morfológicas.

De igual manera se puede plantear, que los biofertilizantes inoculados ejercen una respuesta positiva y significativa sobre esta variable del crecimiento, que mejoran la interacción planta microorganismo, la síntesis de fitohormonas y la capacidad de estas bacterias como

solubilizadoras de fósforo y fijadoras de nitrógeno, lo que coincide con el estudio por parte Juárez (2014), evaluó la influencia de la inoculación de cepas de *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et döbbereiner (Az39) y *Pseudomonas fluorescens* Migula (Ps6) sobre maíz y concluyó que ambos bioproductos promovieron incrementos significativos en el crecimiento e indicadores productivos del cultivo, lo cual está relacionado con el papel de estas dos rizobacterias en el mejoramiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos.

# CAPÍTULO V

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

- En las condiciones estudiadas las bacterias fueron expuestas a un contacto directo con los diferentes herbicidas glifosato, paraquat y atrazina en el medio, demostrando grandes diferencias en el crecimiento. Existe una tendencia negativa de crecimiento y viabilidad por parte de *Azospirillum* sp. y *Pseudomonas fluorescens*, cuando los pH del medio están por debajo de 5, pese a esto ambas bacterias presentaron un mayor potencial y sinergismo para tolerar el glifosato, lo que podría sustentar su uso en la agricultura convencional en dosis recomendadas por el producto.
- En el campo existen factores externos que actúan sobre el producto sintético, principalmente radiación solar, deriva y vientos, mitigando la acción del principio activo, debido a esto los resultados difieren a los *in-vitro*, ya que las bacterias diazótrofes en su medio poseen las condiciones óptimas para su desarrollo y al ser llevadas a campo su viabilidad disminuye al estar expuestas a la combinación (desinfección de semilla y herbicidas), lo cual, provocó un descenso del crecimiento bacteriano de 2 unidades logarítmicas, pese a estos resultados estas bacterias son promisorias ya que al final del ensayo se encontró una biomasa de  $10^7$  UFC, esta concentración es la óptima para que puedan ejercer sus capacidades como bacterias promotoras del crecimiento vegetal mediante la síntesis de fitohormonas, solubilización de P y fijación de N. Siendo aplicables en campo maiceros en combinación con los pesticidas estudiados durante esta investigación.
- Las comunidades microbianas enriquecidas en el suelo se adaptaron al estrés ocasionado por el uso de añadidos sintéticos, evidenciando una respuesta positiva en los indicadores, agronómicos (longitud de raíz, peso seco de raíz y peso seco foliar), del cultivo del maíz tierno variedad “INIAP-101”, en los cuales se observó incrementos significativos en comparación al control.

## 5.2 Recomendaciones

- Ampliar estudios acerca de la compatibilidad de estos bioinsumos con otros pesticidas y en combinación con la fertilización química, que se emplean en las zonas maiceras con énfasis en aquellos que se aplican directamente al suelo y a las semillas.
- Se sugiere realizar otras investigaciones en campo, ya que existen comunidades de bacterias nativas del suelo, que pueden competir con las del biofertilizante, disminuyendo su potencial.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. *Cultivos Tropicales*, 30(2), 113-120.
- Alexandrino, D. A., Mucha, A. P., Almeida, C. M. R., & Carvalho, M. F. (2020). Microbial degradation of two highly persistent fluorinated fungicides-epoxiconazole and fludioxonil. *Journal of Hazardous Materials*, 394.
- Anzalone, A. (2007). *Herbicidas modos y mecanismos de acción en plantas*. Barquisimeto, Venezuela. Fondo editorial del la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".
- Anzalone, A., Ruíz, M., Zambrano, C., y Ortíz., A. (2011). Evaluación de *Zea mays* L. y *Phaseolus vulgaris* L. como bioindicadores de herbicidas imidazolinonas en suelo. *Bioagro*, 23(2), 121-128.
- Arias, D., Mora, R., y Romero, O. (2019). Uso de herbicidas en el control de malezas. Importancia de su conocimiento para el profesional agrónomo. *Opuntia Brava*, 11(1), 204-210.
- Baldani, J., Krieg, N., Baldani, V., Hartmann, U., y Döbereiner, J. (2005). Género II. *Azospirillum*. En D. Brenner, N. Krieg, y J. Staley, *Manual de Bergey de bacteriología sistemática* (Vol. 2, págs. 7-26). Nueva York: Springer-Verlag.
- Banco Central del Ecuador. (2019). *Reporte de coyuntura sector aropecuario*. (BANCO CENTRAL DEL ECUADOR), Quito, Ecuador 38 pp.
- Barreto, D., Valero, N., Muñoz, A., y Peralta, A. (2007). Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. *Zonas Áridas*, 11(1), 240-250.
- Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., y Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En Ferrera R., Alarcón A, *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo* (págs. 170-224). Mexico: Editorial Trillas.

- Benito, N., Magnoli, C., y Barberis, C. (2018). Efecto del glifosato sobre la producción de aflatoxina B1 por cepas de *Aspergillus* sección Flavi aisladas de maíz. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus*, 1(1), 67-77.
- Bennetzen, J., y Hake, S. (2009). *Handbook of maize: genetics and genomics*. New York: Springer Science & Business Media.
- Bravo, E., y León, X. (2013). Monitoreo participativo del maíz ecuatoriano para detectar la presencia de proteínas transgénicas. *La granja, Revista de Ciencias de la Vida*, 17(1), 16-24.
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.
- Carrera, A. (2012). *Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de Azospirillum spp. del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (Zea mays L.) de la Sierra ecuatoriana* (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Ceccon, E. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. *Ciencias*, 1(91), 21-29.
- Chegini, S., y Hassanpour, H. (2015). The effect of *Pseudomonas* bacteria on maize growth and atrazine biodegradation in soil. *Biological Forum – An International Journal*, 7(1), 951-956.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H., y Sa, T. (2005). Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1970-1974.
- Constitución de la República del Ecuador. (2008). *Constitución de la República del Ecuador Asamblea Constituyente*.
- Cool, C. (2010). *Evaluación de bio-fertilizante a base de cepas de Azospirillum spp. en el cultivo de maíz (Zea mays L.) variedad INIAP 101, en el sector Ainche, provincia de Chimborazo* (Tesis de pregrado). Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador.

- Cortés-Patiño, S. L., Vesga-Ayala, N. P., Sigarroa-Rieche, A. K., Moreno-Rozo, L., y Cárdenas-Caro, D. (2015). Sustratos inoculados con microorganismos para el desarrollo de plantas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en etapa de vivero. *Bioagro*, 27(3), 151-158.
- Díaz, A., Castillo, H., Ortiz, F. E., y Espinosa, M. (2019). Tratamiento químico combinado de semilla y su influencia en el crecimiento de plántulas de sorgo, maíz, soya y algodón. *Acta universitaria*, 29. , e2026. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2019.2026>
- Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAOSTAT. (2017). Agriculture Data. FAO, Rome, Italy. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>. [Consultado: 01 de agosto del 2019].
- Fgaier, H., y Eberl, H. (2010). Un modelo de competencia entre *Pseudomonas fluorescens* y patógenos a través de la quelación del hierro. *Revista de biología teórica*, 2(63), 566-578.
- Florida, N., López, C., y Pocomucha, V. (2012). Efecto del herbicida paraquat y glifosato en propiedades del suelo condicionan el desarrollo de bacterias y fungi. *Investigación y Amazonía*, 2(1-2), 35-43.
- Galvis, A., y Adolfo, A. (2017). *Evaluación de deficiencias nutricionales en quinua hidropónica (Chenopodium quinoa Willd.), mediante la técnica del elemento faltante bajo invernadero* (tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador Quito, Ecuador.
- García, E. (2018). Uso del Glifosato y los cultivos transgénicos resistentes. *AgroProductividad*, 11(4), 112-117.
- García, J., Mendoza, A., y Mayek, N. (2012). Efecto de *Azospirillum brasilense* en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia Trópico y Húmedo*, 28(1), 79-84.
- González, B., Robledo, M., Espinosa, A., Martínez, J., Celis, D., Valdivia, R., y Zaragoza, J. (2015). Eficiencia agronómica de fertilización al suelo de macro nutrientes en híbridos de maíz. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(7), 1557-1569.
- Gutiérrez, W., Morán, J., Daboin, B., Ferrer, J., Medina, B., y Villalobos, Y. (2008). Evaluación de diferentes herbicidas sobre el control de malezas, desarrollo, rendimiento y beneficio

- neto relativo del cultivo de la yuca *Manihot esculenta* Crantz bajo las condiciones agroecológicas de la planicie de Maracaibo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 25(1), 26-42.
- Hernández, K., Covacevich, F., Aparicio, V. C., y De Gerónimo, E. (2018). Bacterias nativas del suelo con potencial para la degradación de glifosato y promoción del crecimiento vegetal. *Ciencia del Suelo*, 36(2), 105-114.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, INEC. (2018). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2018*. Superficie y producción-histórico, Quito, Ecuador. Disponible en: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/sipa-estadisticas/estadisticas-productivas> [Consultado: 02 de agosto del 2019].
- Juárez, I. E. M. (2014). Evaluación de las cepas experimentales *Azospirillum brasilense* “Az-39” y *Pseudomonas fluorescens* “Ps-6” en el cultivo de Maíz–AYUI SRL. Buenos Aires, Argentina. 80 pp.
- Kawalekar, J. (2013). Role of biofertilizers and biopesticides for sustainable agriculture. *Journal of Bio Innovation*, 2(3), 73-78.
- Kurhade, C., Gade, R., y Kshirsagar, D. (2019). Effect of pesticide amended soil on population of *Pseudomonas fluorescens* under greenhouse conditions. *International Journal of Chemical Studies*, 7(1), 1265-1269
- López, M. (2018). *Impacto del uso de herbicidas para el control de plantas invasoras en los cuerpos de aguas dulces y marinos* (Tesis de maestría). Universidad de Sherbrooke, Canadá.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Hari, K., Saravanan, V. S., y Sa, T. (2006). Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 84(2), 143-154.
- Mariucci, G. E. G., Suzukawa, A. K., Braccini, A. L., Scapim, C. A., Lima, L. H. D. S., Angelotti, P., & Marteli, D. C. V. (2018). Physiological potential of maize seeds submitted to different treatments and storage periods. *Journal of Seed Science*, 40(1), 60-66.

- Martín, G., y Rivera, R. (2015). Influencia de la inoculación micorrízica en los abonos verdes. Efecto sobre el cultivo principal. Estudio de caso: el maíz. *Cultivos tropicales*, 36(1), 34-50.
- Martínez-Nieto, P., Bernal-Castillo, J., Agudelo-Fonseca, E., y Bernier-López, S. (2012). Tolerancia y degradación del glifosato por bacterias aisladas de suelos con aplicaciones frecuentes de Roundup sl®. *Revista Pilquen -Sección Agronomía*, 14(12), 1-11
- Ortíz, G. (2010). *Evaluación del efecto de cuatro métodos de inoculación de dos cepas de Azospirillum spp., en el cultivo de maíz (Zea mays L.), variedades INIAP 122 y 102, en las provincias de Imbabura y Pichincha* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Parra, Y., y Cuevas, F. (2001). Revisión bibliográfica-Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 23(3), 31-41.
- Pereira, L. C., de Carvalho, C., Suzukawa, A. K., Correia, L. V., Pereira, R. C., dos Santos, R. F., & Osipi, E. A. F. (2020). Toxicity of seed-applied pesticides to *Azospirillum* spp.: an approach based on bacterial count in the maize rhizosphere. *Seed Science and Technology*. *Seed Science and Technology*, 48(2), 241-246.
- Pereira, P., Guimarães, E., Cumba, L., Lataro, L., Rizzato, A., Albuquerque, R., y Ribeiro, D. (2019). Voltammetric techniques for pesticides and herbicides detection- an overview. *International Journal of Electrochem science*, 14(1), 3418 – 3433.
- Pincay, A. (2014). *Caracterización y evaluación de bacterias Pseudomonas sp. solubilizadoras de fósforo, presentes en la rizósfera de maíz (Zea mays L.)* (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador.
- Pitty, A. (2018). Modo de acción y resistencia de los herbicidas que interfieren en el fotosistema II de la fotosíntesis. *Ceiba*, 55(1), 45-59.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Procópio, S. D. O., Fernandes, M. F., Teles, D. A., Sena Filho, J. G., Cargnelutti Filho, A., Vargas, L., & Sant'Anna, S. A. C. (2011). Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura

- da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. *Planta Daninha*, 29, 1079-1089.
- Rangel-Lucio, J. A., Rodríguez-Mendoza, M. D. L. N., Ferrera-Cerrato, R., Castellanos-Ramos, J. Z., Ramírez-Gama, R. M., & Alvarado-Bárceñas, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 269-279.
- Rangel, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos, J., Ramírez, R., y Alvarado, E. (2011). Afinidad y efecto de *Azospirillum* sp. en maíz. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 23(2), 269-279.
- Rao, V. S. (2000). *Principles of weed science*. Santa Clara, California: Editorial CRC Press.
- Reyes I., Alvares L., Elayoubi H., y Valeria A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. *Bioagro*, 20, 37-48.
- Romero, D., Morales, Y., Hernández, A., Castañeda, M., Netzahuatl, A., y Muñoz, J. (2017). *Pseudomonas putida* estimula el crecimiento de maíz en función de la temperatura. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4(1), 80-88.
- Romero-Perdomo, F., Camelo-Rusinque, M., Criollo-Campos, P., y Bonilla-Buitrago, R. (2015). Efecto de la temperatura y el pH en la producción de biomasa de *Azospirillum brasilense* C16 aislada de pasto guinea. *Pastos y Forrajes*, 38(3), 171-175.
- Romero-Perdomo, F. A., Camelo, M., y Bonilla, R. (2015). Response of *Bradyrhizobium japonicum* to alginate in presence of pelleted fungicides on soybean seeds. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 18(2), 359-364.
- Rose, M., Cavagnaro, T., Scanlan, C., Rose, T., Vancov, T., Kimber, S., ..., y Van Zwieten, L. (2016). Impact of herbicides on soil biology and function. In *Advances in Agronomy*, 136, 133-220.
- Rueda, E., Ortega, J., Barrón, J., López, J., Murillo, A., Hernández, L., ..., y Valdez, R. (2015). Los fertilizantes biológicos en la agricultura. *Invurnus*, 10(1), 10-17.

- Ruíz, C., Gómez, M., y Villamizar, L. (2015). Prototipo de formulación y atmósfera de empaque para la cepa antagonista *Pseudomonas fluorescens* Ps006. *Revista colombiana de biotecnología*, 17(2), 95-102.
- Sangoquiza, C. (2017). *Evaluación de Azospirillum sp. y Pseudomonas fluorescens en el cultivo de maíz en la sierra del Ecuador* (Tesis de maestría). Universidad de Granma, Bayamo, Cuba.
- Sangoquiza, C., Yáñez, C., y Borges, M. (2019). Respuesta de la absorción de nitrógeno y fósforo de una variedad de maíz al inocular *Azospirillum sp.* y *Pseudomonas fluorescens*. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 11(1), 84-95.
- Sangoquiza, C. A., Viera, Y., y Yáñez, C. F. (2018). Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum spp.* frente a diferentes tipos de estrés. *Centro Agrícola*, 45(1), 40-46.
- Santillana, N. (2006). Producción de biofertilizantes utilizando *Pseudomonas sp.* *Ecología Aplicada*, 5(1-2), 87-91.
- Santos, J. B., Jakelaitis, A., Silva, A. A., Vivian, R., Costa, M. D., y Silva, A. F. (2005). Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. *Planta Daninha, Viçosa-MG*, 23(4), 683-691.
- Santos, M. S., Rondina, A. B., Nogueira, M. A., y Hungria, M. (2020). Compatibility of *Azospirillum brasilense* with pesticides used for treatment of maize Seeds. *International Journal of Microbiology*, 2020.
- Sindhu, S., Parmar, P., Phour, M., y Sehrawat, A. (2016). Potassium solubilizing microorganisms (KSM) and their effect on improving plant growth. En V. Meena, B. Maurya, J. Verma, & R. Meena, *Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture* (págs. 171-185). Springer, Singapore.
- Taberner, A., Cirujeda, A., y Zaragoza, C. (2007). *Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas 100 preguntas sobre resistencias*. Roma. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Tejada, J. L., y Helfgott, S. (2018). Evaluación técnica y económica de atrazina, pendimetalin y metribuzin en maíz amarillo duro. *Idesia (Arica)*, 36(4), 121-126.

- Travaglia, C., Masciarelli, O., Fortuna, J., Marchetti, G., Cardozo, P., Lucero, M., ... y Reinoso, H. (2015). Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. *Crop Protection*, 77, 102-109.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J., & Van der Lelie, D. (2011). Genómica comparada y análisis funcional de la adaptación específica de nicho en *Pseudomonas putida*. *FEMS Reseñas de microbiología*, 35(2), 299-323.
- Yáñez, C., Zambrano, J., y Caicedo, M. (2013). *Guía de Producción de maíz para pequeños agricultores y agricultoras*. Quito, Ecuador: INIAP, Programa de Maíz, 28p, (Guía N° 96).
- Yáñez, G., Clavijo, F., y Cool, C. A. (2015). *Biofertilizante. Fertibacter-maíz*. (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias- Estación Experimental Santa Catalina), Quito, Ecuador.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Medios de cultivo utilizados

El medio de cultivo específico para colonias bacterianas pertenecientes al género *Azospirillum* sp. se detalla en la Tabla 20; mientras, que para el género *Pseudomonas* los componentes son detallados en la Tabla 21

**Tabla 20**

*Medio Agar Rojo Congo (Azospirillum sp.)*

Reactivos	Cantidad/1000 ml
Ácido Málico	5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
NaCl	0.1 g
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.015 g
KOH	4.8 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Solución Rojo –Congo	15 ml
Agar	15 g
Agua Destilada	985 ml
pH	7.0

**Tabla 21**

*Medio Agar King B (Pseudomonas)*

Reactivos	Cantidad/1000 ml
Agua Peptonada	20 g
Fosfato monopotásico	1.5 g
Sulfato de magnesio	1.5 g
Glicerina o glicerol	10 ml
Agar - Agar	15 g
pH	7.2

**Anexo 2.** Caldo Nutritivo para la fermentación (Tabla 22).

**Tabla 22**

*Componentes del Caldo Nutritivo*

Reactivos	Cantidad
Extracto de carne	3 g
Peptona Bacteriana	2 g
Cloruro de Sodio ClNa	5 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1

Anexo 3. Análisis de suelo



**INIAP**  
INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

**ESTACION EXPERIMENTAL "SANTA CATALINA"**  
LABORATORIO DE MANEJO DE SUELOS Y AGUAS  
Km. 14 1/2 Panamericana Sur, Apdo. 17-01-340  
Quito-Ecuador Telf.: 690-691/92/93 Fax: 690-693

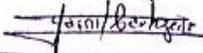


**REPORTE DE ANALISIS DE SUELOS**

<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL PROPIETARIO</b></p> <p>Nombre : Dr. Jose Zambrano Dirección : Mejía Ciudad : Teléfono : Fax :</p>	<p style="text-align: center;"><b>DATOS DE LA PROPIEDAD</b></p> <p>Nombre : EESC Provincia : Pichincha Cantón : Mejía Parroquia : Cutuglagua Ubicación :</p>
<p style="text-align: center;"><b>DATOS DEL LOTE</b></p> <p>Cultivo Actual : Cultivo Anterior : Fertilización Ant. : Superficie : Identificación : Turba+Suelo</p>	<p style="text-align: center;"><b>PARA USO DEL LABORATORIO</b></p> <p>N° Reporte : 5.263 N° Muestra Lab. : 49876 Fecha de Muestreo : 25/10/2019 Fecha de Ingreso : 28/10/2019 Fecha de Salida : 12/11/2019</p>

Nutriente	Valor	Unidad	INTERPRETACION					
N	160.00	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
P	30.00	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
S	31.00	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
K	0.34	meq/100 ml	BAJO MEDIO ALTO					
Ca	5.43	meq/100 ml	BAJO MEDIO ALTO					
Mg	1.82	meq/100 ml	BAJO MEDIO ALTO					
Zn	5.60	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
Cu	4.50	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
Fe	371.00	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
Mn	6.00	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
B	1.30	ppm	BAJO MEDIO ALTO					
pH	6.43		0	5.5	6.5	7.0	7.5	8.0
Acidez Int. (Al+H)		meq/100 ml	Acido Lig. Acid. Práctic. Neutro Lig. Alc. Alcalino					
Al		meq/100 ml	ADECUADO LIGERAMENTE TOXICO TOXICO					
Na		meq/100 ml	No Salino Lig. Salino Salino Muy Salino					
CE		mmhos/cm	BAJO MEDIO ALTO					
MO	9.70	%	BAJO MEDIO ALTO					

Ca	Mg	Ca+Mg	(meq/100ml)	%	ppm	%			Clase Textural
Mg	K	K	Σ Bases	NTot	Cl	Arena	Limo	Arcilla	
3,0	5,4	21,3	7,6			57	36	7	Arcillo-Arenoso

  
RESPONSABLE LABORATORIO

  
LABORATORISTA