

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

**“EFECTO DEL *Trichoderma harzianum*. EN EL AGUA DE REGADÍO
Y LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO”**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

MARÍA JOSÉ SALAZAR LÓPEZ

TUTOR:

Ing. Mg. Jorge Dobrosnki Arcos

Cevallos – 2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Quien suscribe, SALAZAR LÓPEZ MARÍA JOSÉ, portadora de cédula identidad número: 180480795-4, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EFECTO DEL *Trichoderma harzianum*. EN EL AGUA DE REGADÍO Y LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO”. Es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

SALAZAR LÓPEZ MARÍA JOSÉ

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFECTO DEL *Trichoderma harzianum*. EN EL AGUA DE REGADÍO Y LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.

SALAZAR LÓPEZ MARÍA JOSÉ

EFFECTO DEL *Trichoderma harzianum*, EN EL AGUA DE REGADÍO Y LA MICROBIOLOGÍA DEL SUELO.

REVISADO POR:

Ing. Mg. Jorge Dobronski Arcos
TUTOR

Ing. Mg. Alberto Gutiérrez
BIOMETRISTA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO:

FECHA

Ing. Mg. Hernán Zurita Vásquez
PRESIDENTE

Ing. Mg. Marco Pérez Salinas
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

Ing. Mg. Rita Santana Mayorga
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en este largo camino, también agradezco infinitamente a mi abuela Blanca Valle y mi madre Roció López por su apoyo y esfuerzo para que pueda culminar mi carrera.

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica, especialmente al tutor de tesis, Ing. Mg. Jorge Dobronski, a quien con sus acertados consejos, tiempo y voluntad ha permitido culminar con éxito la presente investigación.

Agradezco infinitamente Dr. Víctor Hugo Abril por fomentar en mí el gusto por la química, enseñarme a nunca darse por vencido, a luchar por alcanzar las metas propuestas.

Agradezco con todo el corazón a mi querido Ing. Octavio Beltrán por impulsar en mí el gusto por la agronomía, fue quien me oriento con sus consejos, conocimientos y capacidades en el inicio de mi vida estudiantil, que me servirán para toda la vida, siempre le estaré profundamente agradecida

Agradezco al Ing. Mg. Luciano Valle, Asesor de Redacción Técnica, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de mi carrera, de la tesis y sobre todo por su paciencia para que este trabajo pudiera llegar a culminarse.

Agradezco también a mis profesores Dra. Marta Dávila; Dr. Carlos Vásquez; Ing. Ricardo Guerrero y Ing. Segundo Curay, por su valiosa amistad y los innumerables consejos, que llevare en mente y corazón para ser una mejor persona.

Agradezco a Nataly Paredes Carreño querida amiga, por brindarme su apoyo y paciencia en los momentos malos y buenos vividos juntas.

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme en este largo camino y darme fuerza para poder alcanzar y concluir esta meta con gran éxito.

A mi abuela Blanca Valle por ser mi luz al final del túnel, mi amor verdadero, mi apoyo incondicional en momentos donde se me hizo difícil esta etapa de la vida universitaria, un pilar fundamental para que este trabajo fuera realizado y saliera a la luz.

A mi madre Roció López ejemplo de lucha y valor, que me ha brindado su apoyo, comprensión y amor, en los momentos difíciles, que me enseñó que el que “persevera alcanza sus metas”.

A mis hermanas y sobrinos, en especial a Katrin Salazar por siempre apoyarme y estar conmigo, la amo.

A Manuel Núñez, persona incondicional que me brindo su amor y comprensión, que me tomo de la mano y me enseñó un mundo lleno de amor y felicidad, mi aliado en este este largo camino.

A mi amado Brunno, por enseñarme que las mejores cosas, vienen en frascos pequeños.

MARÍA JOSÉ SALAZAR LÓPEZ

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO	3
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	3
2.1.1 Contaminación del canal	3
2.1.2 Vida microbiana	4
2.1.3 Control biológico.....	5
2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES	6
□ VARIABLE DEPENDIENTE: Saneamiento de agua-suelo	6
□ VARIABLE INDEPENDIENTE	12
CAPÍTULO III	17
3.1 HIPÓTESIS	17
3.2 OBJETIVOS	17
3.2.1 GENERAL	17
3.2.2 ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO IV	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO	18
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR	18
4.2.1 Suelo	18
4.2.2 Clima y Precipitación	18
4.3 MATERIALES Y EQUIPOS	18
4.3.1 Equipos	18

4.3.2	Materiales de laboratorio	19
4.4	FACTOR DE ESTUDIOS	20
4.5	TRATAMIENTOS	21
4.6	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
4.7	VARIABLE RESPUESTA.....	21
4.7.1	Primera toma de muestras de agua	21
4.7.2	Reconocimiento, colocación de tanques de 100 litros e inoculación de <i>T. harzianum</i>	22
4.7.3	Segunda toma de muestras de agua más <i>Trichoderma harzianum</i>	24
4.7.4	Preparación y primera toma de muestra de suelo	24
4.7.5	Colocación de sustrato en macetas	24
4.7.6	Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i>	25
4.7.7	Segunda toma de muestras de suelo más <i>Trichoderma harzianum</i>	25
4.7.8	Tercera toma de muestras de suelo más <i>Trichoderma harzianum</i>	26
4.7.9	Protocolo y preparación de medios	27
4.7.10	Metodología de análisis microbiológico de suelos.....	29
4.7.11	Metodología de análisis e identificación de <i>Trichoderma harzianum</i>	30
4.8	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	31
CAPÍTULO V		32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		32
5.1	Efecto de <i>Trichoderma harzianum</i> en el agua	32
5.2	Efecto del agua tratada con Tricomplex sobre la vida microbiana del suelo....	36
CAPÍTULO VI.....		40
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS		40
6.1	CONCLUSIONES	40
6.2	BIBLIOGRAFÍA	41
6.3	ANEXOS	46

CAPÍTULO VII.....	58
PROPUESTA	58
7.1 TÍTULO	58
7.2 DATOS INFORMATIVOS	58
7.3 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA.....	58
7.4 JUTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	58
7.5 OBJETIVO	59
7.6 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	59
7.7 METOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	59
7.8 ADMINISTRACIÓN.....	60

ÍNIDE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios De Calidad Admisibles Para Aguas De Uso Agrícola	11
Tabla 2. Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola.....	12
TABLA 3. Clasificación Taxonómica	13
TABLA 4. Tratamientos agua.....	21
TABLA 5. Desempeño De Las Variables Agronómicas Bacterias Y Hongos.....	38
Tabla 6. Tabla de homogeneidad de pruebas de Tukey.....	39

ÍNIDE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de biorremediación.....	9
Figura 2. Metabolismo microbiano	10
Figura 3. <i>Trichoderma harzianum</i>	14
Figura 4: Cepas de <i>Trichoderma harzianum</i>	23
Figura 5: Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i>	24
Figura 6: Colocación de macetas y tensiómetro.....	25
Figura 7: Muestra de suelo (14 días).....	26
Figura 8: Muestras de suelo (24 días)	27
Figura 9: Disoluciones con buffer	28
Figura 10: Incubación.....	28
Figura 11: Protocolo de análisis de suelos	30
Figura 12 Efecto del agua saneada con <i>T. harzianum</i> sobre <i>E.coli</i>	32
Figura 13 Efecto de <i>T. harzianum</i> sobre <i>klebsiella sp.</i>	33
Figura 14 Eficiencia de <i>T. harzianum</i> sobre la bacteria <i>Salmonella sp.</i>	34
Figura 15 Influencia de <i>T. harzianum</i> sobre <i>B.subtilis</i>	35
Figura 16 Desarrollo de <i>T. harzianum</i> sobre <i>Proteus sp.</i>	35
Figura 17: Influencia de <i>T. harzianum</i> sobre <i>Chromartium sp.</i>	36

RESUMEN

El uso de microorganismos benéficos como el *Trichoderma harzianum*, en la agricultura, favorece la reducción de la contaminación de suelos y medio ambiente causado por los agroquímicos. El presente trabajo se realizó en la provincia de Tungurahua en el sector Unamuncho en la florícola Sanna-flowers, El objetivo fue determinar el efecto de *Trichoderma harzianum* en el tratamiento del agua de regadío y el mejoramiento de la microbiología del suelo.

Los análisis microbiológicos de suelo y agua se realizaron en Plantsphere Laboratories, grupo BIONIKA y el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato. Se utilizó el producto Tricomplex en dosis de 50ml, 75ml y 100ml diluidas en 100 lt. Los análisis microbianos mostraron un biocontrol del agua, causando que los índices de Enterobacterias como son: *e-coli*, *klebsiella*, *Proteus sp.*, *Salmonella*, muestren valores de 0,10 ufc mientras que *T. harzianum* se diseminó con 9,94 upc en el agua. Para identificar si con el agua tratada se mejora la vida microbiana del suelo se procedió a regar unidades experimentales que contenían suelo agrícola de la florícola y se pudo constatar la propagación a los 14 días (7.77 ufc) y 24 días (8 ufc) *B. subtilis* y *T. harzianum*, así como de otros microorganismos benéficos para los cultivos y que ayudan al suelo en procesos de solubilización de fosfatos como el *Aspergillus* y *Penicillium sp.* que ayudan en la degradación de materia orgánica.

Palabras claves:

Entobacterias; *B. subtilis*: biocontrol; microorganismos

SUMMARY

The use of beneficial microorganisms such as *Trichoderma harzianum*, in agriculture, favors the reduction of soil and environmental contamination caused by agrochemicals. The present work was carried out in the province of Tungurahua in the sector Unamuncho in the floriculture Sanna-flowers, the objective was to determine the effect of *Trichoderma harzianum* in the treatment of irrigation water and the improvement of soil microbiology. Microbiological analyzes of soil and water were carried out in Plantsphere Laboratories, BIONIKA group and the Plant Health Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato. The product Tricomplex was used in doses of 50ml, 75ml and 100ml diluted in 100 lt. The microbial analyzes showed a biocontrol of the water, causing the Enterobacteria indices such as: *e-coli*, *klebsiella*, *Proteus sp.*, *Salmonella*, to show values of 0.10 cfu while *T. harzianum* was disseminated with 9.94 upc in water. to identify if the treated water improves the microbial life of the soil, experimental units containing agricultural soil from the floricultural garden were irrigated and the propagation was observed at 14 days (7.77 cfu) and 24 days (8 cfu) *B. subtilis* and *T. harzianum*, as well as other microorganisms beneficial for crops and that help the soil in processes of solubilization of phosphates such as *Aspergillus* and *Penicillium sp.* that help in the degradation of organic matter.

Keywords:

Enterobacteria; *B. subtilis*; biocontrol; microorganisms

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El agua de regadío en Ambato principalmente se obtiene de acequias o captaciones que se encuentran en las zonas rurales y no garantiza una adecuada sanidad en los productos agrícolas, motivo por el cual se debe buscar tecnologías amigables con el ambiente que permitan reducir la contaminación del agua y las fuentes de captación.

Las pequeñas comunidades enfrentan un problema mayor, dado que sus condiciones socioculturales, económicas, ambientales y técnicas, limitan la implementación de alternativas de tratamientos tecnificados, las cuales son usadas comúnmente en las grandes ciudades para la purificación del agua (CESA, 2003).

La calidad del agua es un problema muy serio, ya que los agricultores utilizan en el cultivo de diversos productos agrícolas, tanto para consumirlos en propiedad como para ser comercializados en los mercados del centro del país.

El agua contaminada del río Cutuchi usada para riego afecta principalmente la salud pública; los efluentes que se descargan en esta cuenca contienen grasas, aceites, alto contenido de materia orgánica, DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno) estén fuera del límite permitido (CESA, 2003).

Además, en todo su cauce desde el sector de Lasso, provincia de Cotopaxi, alberga efluentes de aguas servidas, fábricas, establos, hospitales y mataderos, sin ningún tratamiento previo; para luego formar el canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, a partir del sector sur de la ciudad de Latacunga. El problema de la contaminación se agrava, ya que recibe aguas servidas de uso doméstico, aguas residuales de algunas fábricas de alimentos, entre estas lecheras y cárnicas, del Hospital General de Latacunga, del Hospital del Seguro Social, del camal municipal, a más de la contaminación por actividades agrícolas (CNRH, 2002).

El *Trichoderma harzianum* es un hongo principalmente anaerobio que se localiza en la mayoría de suelos agrícolas y otros sustratos, de manera natural; corresponde a la subdivisión Deuteromycetes; existiendo más de 30 especies de éste hongo, las cuales brindan beneficios para la agricultura, a más de un control biológico, pues tiene un rápido crecimiento y desarrollo, gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción para uso en la agricultura (Infante, 2009).

El principal beneficio para la agricultura es el antagonismo con microorganismos patógenos para las plantas y cultivos, por su capacidad de producir secreciones tóxicas que causan la degradación y muerte en los hongos fitopatógenos que habitan en el suelo (microparasitismo), en la degradación de las paredes celulares de las hifas de los hongos patógenos (degradación), en la producción de químicos volátiles antibióticos antifúngales que inhiben los hongos, en la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio (Vallejo, 2014).

Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y hábitats, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permite ser eficiente agente de control; de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos. Sirve como control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos; la competencia de *Trichoderma sp.*, por nutrientes, es principalmente por hierro, carbono y nitrato (Espinoza, 2013).

El presente trabajo tuvo por objetivo mejorar la calidad del agua contaminada del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato que se utiliza para regadío, por la acción del *Trichoderma harzianum*, además de conocer cuál es la dosis adecuada para sanear el agua destinada para regadío, evaluando la capacidad que puede tener el hongo para reproducirse en dicha agua y las posibilidades de mejorar la vida microbiana del suelo agrícola.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En el proceso de indagación y revisando el repositorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, así como documentos físicos en la biblioteca de la misma; se han encontrado trabajos investigativos similares.

Vásquez (2010), en su trabajo de investigación determinó que dentro de los organismos utilizados en remediación, se ha estudiado el género *Trichoderma harzianum*., el cual puede degradar insecticidas y herbicidas con el uso adicional de microorganismos eficientes y bacterias importantes para la biorremediación.

Pesántez y Castro (2016), en su trabajo de investigación “Potencial de cepas de *Trichoderma spp.*, para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo” manifiestan que se comprobó que con la inoculación de las cepas de *Trichoderma sp.*, se disminuyó el contenido de compuestos contaminantes como los hidrocarburos en más del 47% en el suelo, además en sentido informativo que los metales pesados cadmio y níquel se redujeron en menor cantidad, pero en el caso del plomo alcanzó hasta 53,72% a los 15 cm con la cepa *T. harzianum*.

2.1.1 Contaminación del canal

Pozo (2012), manifiesta que estudios del Consejo Provincial, Municipios y el Ministerio del Ambiente a partir del 2008 y 2009 con la vigencia de la nueva Constitución de la República y la Ley COOTAD, respectivamente; que están en la micro cuenca del río Cutuchi y donde se captan las aguas para el canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, son las instituciones encargadas de preservar y controlar la calidad de estas aguas que luego van a ser usadas para regar un número considerable de hectáreas de terrenos fértiles cuyas producciones de

hortalizas, legumbres, entre otras, van a ser expandidas en los principales mercados del centro del país.

El estudio reporta que las aguas residuales que generan fábricas, agroindustrias y las aguas servidas de algunos centros poblados y con más incidencia las aguas servidas de la ciudad de Latacunga van directamente al Río Cutuchi, sin ningún tratamiento; según estudios realizados por SENAGUA en el canal, se encuentran metales pesados como selenio, magnesio, cromo y arsénico siendo este último altamente contaminante, lo cual determina las consecuencias negativas al medio ambiente y por ende al ecosistema. Con la directa incidencia en la salud de sus pobladores y particularmente en los niños, que es el grupo humano más vulnerable.

El Gobierno Provincial de Tungurahua (2014), señala que el canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato, se alimenta con las aguas de la cuenca del río Cutuchi, estas aguas son usadas para regar un número considerable de terrenos en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua.

Las causas contaminantes del canal son las aguas servidas de las ciudades asentadas a lo largo de la cuenca del río, los efluentes de las industrias que se encuentran en los alrededores del río, plaguicidas utilizados en las labores agrícolas de la cuenca alta; dando como resultado una calidad del agua inadecuada para todos los usos, en especial con parámetros fisicoquímicos que afectan la producción de hortalizas.

2.1.2 Vida microbiana

Guerrón (2013), en su trabajo de investigación manifiesta que la disminución de la microflora y microfauna del suelo se debe precisamente a la aplicación indiscriminada de pesticidas y productos agroquímicos. La mayoría de pesticidas no son aplicados directamente al suelo, aunque en ocasiones muy puntuales si lo son, razón por la cual disminuyen directa o indirectamente la vida microbiana del suelo, ya que muchos de los productos utilizados son de amplio espectro afectando así también a los hongos y bacterias del suelo.

La utilización indiscriminada de agroquímicos ha sido causante de varios efectos, como: la salinización y alcalinización o aumento de la conductividad eléctrica del suelo. Dicho

problema puede ser superado con tecnologías alternativas, como la disminución del uso de agroquímicos y motivación para el uso de productos orgánicos y biológicos, con los cuales se puede obtener flores de calidad.

2.1.3 Control biológico

Peña (2009), en su trabajo de investigación mencionó que el control biológico consiste en reducir la población de determinados organismos nocivos a través del uso de organismos vivos, que presentan efectos antagónicos con otros organismos como un grupo de hongos y bacterias, esta acción es aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Actualmente, existe el genero *Trichoderma harzianum* y se destacan por ser más utilizado para el biocontrol de patógenos fúngicos del suelo”.

Méndez *et al.*, (2015), en su investigación titulada “Disminuir el uso excesivo de agroquímicos” observaron que varias especies de *Trichoderma sp.*, son capaces de degradar diversos agroquímicos y convertirlos en sustancias no tóxicas, con un efecto de biorremediación). Dicha actividad varía de acuerdo a la especie y al agroquímico empleado; demostrando que el *T. harzianum* es capaz de utilizar el insecticida organofosforado clorpirifos como fuente de azufre y fósforo, a más de que dicha especie degrada el glifosato y ácido aminometil fosfórico.

Bell (2009), en su investigación titulada “Elaboración de bioinsecticida a partir de los hongos *Beaveria bassiana* y *Trichoderma lignorum* para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*)” como objetivo tenían desarrollar una formulación biológica utilizando una mezcla de esporas de *B. bassiana* y *Trichoderma sp.*, (hongos filamentosos).

Para ello, desarrollaron cinco formulaciones con relaciones de 1:1, 6:4, 4:6, 3:7 y 2:8 de *B. bassiana* y *Trichoderma sp.*, respectivamente.

Las formulaciones presentaron a las 24 horas el 95% de viabilidad; después de 10 días el 100% de las formulaciones fueron puras. Las formulaciones 6:4, 1:1 y 2:8 infectaron a los individuos en su totalidad en 6 días, mientras que las formulaciones 4:6 y 3:7 a los 8 días. Observando diferencias estadísticas entre estos dos grupos y obteniendo como resultado que las formulaciones 6:4, 1:1 y 2:8 de *B. bassiana* y *Trichodermasp.*, poseen mayor actividad infecciosa sobre la hormiga en el laboratorio.

2.1.4 *Trichoderma harzianum* como método de control

Sandoval, et al., (2003), al investigar *Trichoderma harzianum* y la combinación de la solarización en el clavel (*dianthus barbatus*) como biocontrol de hongos del suelo obtuvieron que antes de realizar la siembra o trasplante de las estacas realizaron solarización y la aplicación del *Trichoderma* para el control de enfermedades como *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* en el cultivo de clavel, indicaron que estos hongos provocan el desecamiento y marchitez de la planta y al aplicar este método después de 15 días, obtuvo una mejora, ya que el porcentaje de plantas enfermas disminuyó en un 54,8% obteniendo datos significativos; así este método se recomienda como un biocontrol para el cultivo de clavel.

Cano (2011), concluye que el aporte del *Trichoderma harzianum* en la sustitución de fungicidas químicos adquiere gran importancia por la reducción directa de residuos tóxicos en los suelos y aguas destinadas para el regadío. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales.

Por otra parte Lara (2010), en la investigación indica que el *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico tiene diversas ventajas, ya que posee un crecimiento rápido y puede desarrollarse en varios sustratos; probablemente sea el hongo polifacético más versátil y beneficioso presente en los suelos, es capaz de parasitar, controlar y destruir varios hongos, nematodos y otros fitopatógenos que destruyen y atacan muchos cultivos. Este hongo actúa por competencia de nutrientes, produce metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y microparasitas

2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES

- **VARIABLE DEPENDIENTE: Saneamiento de agua-suelo**

Contaminación del agua de regadío

El agua utilizada en la agricultura se recicla de nuevo en forma de agua superficial o subterránea, no obstante la agricultura al mismo tiempo es causa y víctima de la contaminación de los recursos hídricos. Es causa, por la descarga de contaminantes y

sedimentos en las aguas superficiales o subterráneas, así como la salinización de las tierras de regadío. Es víctima, por el uso de aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas que contaminan a su vez los cultivos y transmiten enfermedades a los consumidores y trabajadores agrícolas.

Análisis químicos realizados en fuentes de agua de diferentes fincas de la zona hortícola de Corrientes identificaron una elevada concentración de nitratos, lo que la convierte en no apta para el consumo humano. La contaminación tendría su origen en la actividad agrícola por el uso de abonos, especialmente cuando las dosis de fertilizantes exceden los requerimientos nutricionales de los cultivos.

Las aguas residuales agrícolas en la mayor parte del territorio nacional se caracterizan por sus altos contenidos de nitratos, fosfatos, metales pesados, procedentes de las industrias, minería, fertilizantes, pesticidas, plaguicidas y biocidas en general; la minería está aportando metales pesados a las fuentes de aguas que afectan a la salud humana, flora y fauna, generando una fuerte contaminación. En el Ecuador de cada 100 litros de agua que se emplea: 81,1 riego para agricultura; 12,3 uso doméstico; 6,3 en industria y 0,3 en otros usos (SENAGUA, 2011).

Contaminación del suelo

MAGAP (2010), definió la degradación del suelo como aquel proceso que disminuye su capacidad real y/o potencial para producir bienes o prestar servicios, estableciendo posteriormente en 1982 la "Carta Mundial de los Suelos". La degradación de los suelos se da por varios factores tales como: la práctica de la agricultura convencional, la utilización excesiva y sin ninguna guía técnica sobre el uso y su aplicación de agroquímicos, lo cual ha provocado en el Ecuador, en particular en las zonas rurales que los suelos se vuelvan improductivos y estériles.

Existen también microorganismos que son perjudiciales para las plantas por lo que el agricultor trata de eliminarlos sin tomar en cuenta que al hacerlo está afectando a los organismos benéficos del mismo modo. Esto debería cambiar pues en un suelo con buenos niveles de microorganismos benéficos no existirá la aparición de los otros, pues los primeros los controlan de forma natural, ya sea por antagonismos o por superioridad numérica.

Pero lamentablemente la realidad es otra, al respecto Asaho (2012), menciona que en las últimas décadas, casi el 11% del suelo fértil de la tierra ha sido tan erosionado, tan alterado químicamente o tan endurecido físicamente, que su función biótica original (su capacidad para procesar nutrientes de forma que puedan ser utilizados por los organismos vivos) ha resultado dañada; cerca del 3% del suelo ha sido degradado prácticamente hasta el punto de no poder seguir cumpliendo esa función.

Biorremediación de agua y suelo

La biorremediación surgió recientemente como alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados, donde se aprovecha el potencial de los microorganismos para mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos. La biorremediación es la mejor opción para la limpieza de sitios contaminados desde el punto de vista económico y ambiental, sin embargo, no puede aplicarse en todos los casos (Saval, 1997).

Las medidas biocorrectivas o los sistemas de biorremediación consisten principalmente en el uso de los microorganismos naturales (levaduras, hongos o bacterias) existentes en el medio para descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias de carácter menos tóxico o bien inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Las medidas biocorrectoras se emplean en la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio, si se producen en condiciones aerobias (presencia de un medio oxidante), o bien de tipo anaerobio, en condiciones anaerobias (medio reductor).

La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. No obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo: los hongos y más recientemente, las plantas "fitorremediación" que es un campo altamente prometedor (Garbisu, 2002).

Existen diferentes tipos de biorremediación, en estos procesos se utilizan microorganismos o plantas capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes, tales como metales

pesados y compuestos orgánicos. Básicamente, los procesos de biorremediación pueden ser de tres tipos:

Degradación enzimática: consiste en emplear enzimas en sitios contaminados con el fin de degradar sustancias nocivas. Estas enzimas se obtienen por bacterias que las producen naturalmente, o por bacterias modificadas genéticamente. Estas enzimas son utilizadas en tratamientos donde los microorganismos no pueden desarrollarse debido a la toxicidad de los contaminantes (Reinoso, 2016).

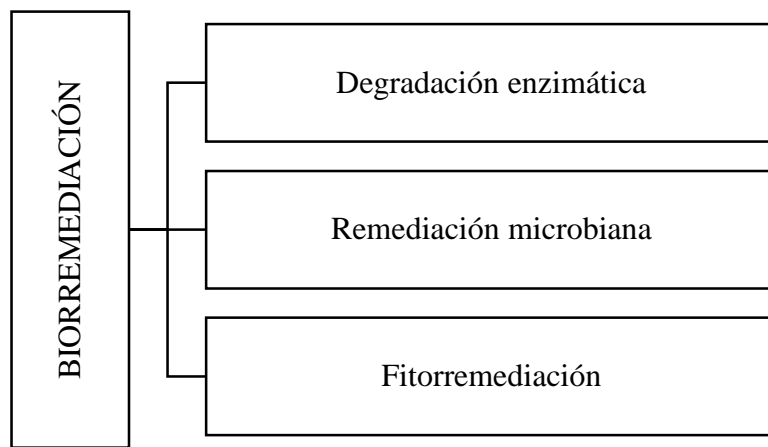


Figura 1. Tipos de biorremediación

Elaborado por: Salazar, 2017

Remediación microbiana: utiliza microorganismos directamente en el foco de la contaminación, estos pueden ser los ya existentes (autóctonos) o pueden venir de otros ecosistemas, en dicho caso son agregados o inoculados. Existen, por ejemplo, bacterias y hongos que pueden degradar con relativa facilidad petróleo y sus derivados, pesticidas, herbicidas, éteres, alcoholes simples, entre otros. Los metales pesados como uranio, cadmio y mercurio no son biodegradables, pero las bacterias y hongos pueden concentrarlos, para que aislados sean eliminados más fácilmente. En el siguiente gráfico se resume el proceso de biorremediación por microorganismos.

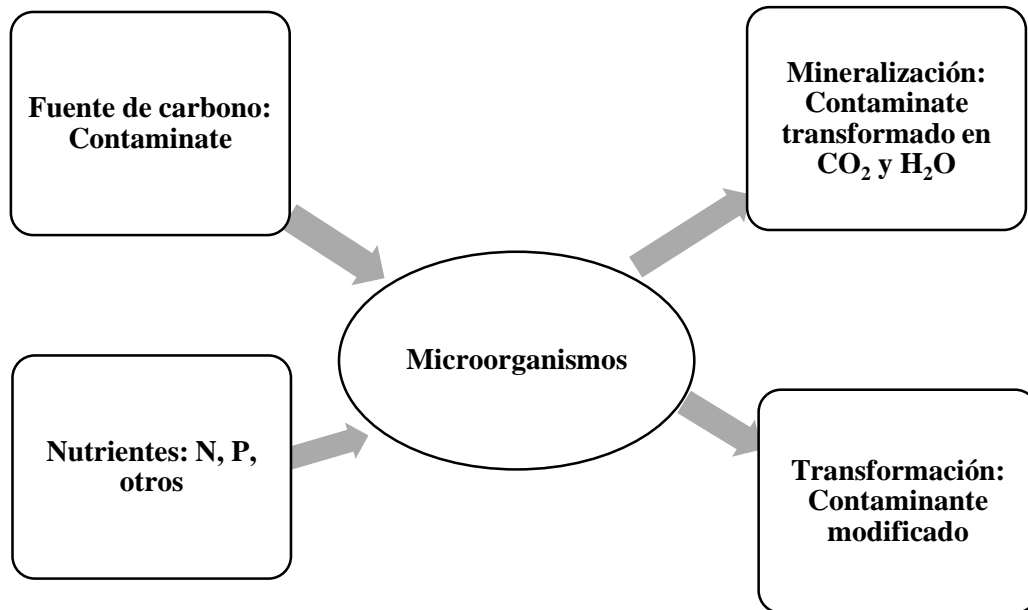


Figura 2. Metabolismo microbiano

Elaborado por: Salazar, 2017

Reinoso *et al.*, 2006, mencionan que la fitorremediación: En el siglo XVIII Joseph Priestley, Karl Scheele y Antoine Lavoisier demostraron que en presencia de luz, las plantas son capaces de descontaminar la atmosfera; sin embargo, no fue hasta los años 70 que se reconoció la habilidad de las plantas para limpiar aguas y suelos contaminados.

Entre las ventajas de la fitorremediación tenemos:

1. Las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar aguas contaminadas.
2. Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes, por ejemplo: purificar reservorios.

Normas de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso agua

La presente técnica ambiental es dictada bajo el amparo de la ley de gestión Ambiental y del reglamento a la ley de gestión ambiental para la prevención y control de la contaminación ambiental y se somete a las disposiciones de estos.

La presente norma técnica determina o establece:

- Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado
- Los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos
- Métodos y procedimientos para determinar la presencia de contaminantes en el agua.

Criterios de calidad de aguas de uso agrícola o de riego

Se entiende por agua de uso agrícola empleada para la irrigación de cultivos y otras actividades conexas o complementarias que establezcan los organismos competentes.

Se prohíbe el uso de aguas servidas para riego, exceptuándose las aguas servidas tratadas y que cumplan con los niveles de calidad establecidos en esta norma. (FAO, 2010)

Tabla 1 Criterios De Calidad Admisibles Para Aguas De Uso Agrícola

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Sólidos disueltos totales		mg/l	3 000,0
Transparencia de las aguas medidas con el disco secchi.-Vanadio			mínimo 2,0 m
Aceites y grasa	V	mg/l	0,1
	Sustancias solubles en hexano	mg/l	0,3
Coniformes Totales			1 000
Huevos de parásitos	nmp/100 ml		
Zinc		Huevos por litro	cero
		mg/l	2,0

Fuente: FAO (2010)

Elaborado por: Salazar, 2017

Tabla 2 Criterios de calidad admisibles para aguas de uso agrícola

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Boro (total)	B	mg/l	1,0
Cadmio	Cd	mg/l	0,01
Carbamatos totales	total de carbamatos CN ⁻	mg/l	0,1
Cianuro (total)	Co	mg/l	0,2
Cobalto	Cu	mg/l	0,05
Cobre Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg/l	2,0
Fluor	F	mg/l	0,1
Hierro	Fe	mg/l	1,0
Litio	Li	mg/l	5,0
Materia flotante	visible	mg/l	2,5
Manganeso	Mn	mg/l	Ausencia
Molibdeno	Mo	mg/l	0,2
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	0,001
Organofosforados (totales)	Concentración de organofosforados totales.	mg/l	0,2
	Concentración de organoclorados totales.	mg/l	0,01
	Ag	mg/l	0,2
	pH	mg/l	0,1
Organoclorados (totales)	Pb	mg/l	0,2
	Se	mg/l	0,05
Plata		mg/l	6-9
Potencial de hidrógeno		mg/l	0,05
Plomo		mg/l	0,02
Selenio		mg/l	

Fuente: FAO (2010)

Elaborado por: Salazar, 2017

• **VARIABLE INDEPENDIENTE:** (*Trichoderma harzianum*)

Martínez (2002), menciona que en 1974, Persoon describió el genero *Trichoderma harzianum* y en 1932, Weindling demostró su acción como micoparásito natural.

Su utilización en experimentos de control biológico fue a partir de 1970 cuando desarrollaron los estudios para su uso en cultivos ornamentales y hortalizas.

Debido a la capacidad de originar diversos metabolitos y adaptarse a numerosas condiciones ambientales y sustratos. Lo podemos encontrar en distintas zonas y hábitats, por lo que *Trichoderma harzianum* constituye un grupo de microorganismos cosmopolitas, de tipo filamentosos pertenecientes a la siguiente clasificación taxonómica:

TABLA 3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Taxón	Nombre
Reino	Mycetae (hongos verdaderos)
División	: Eumycota
Subdivisión	: Deuteromycotina
Clase	: Hyphomycetes
Orden	: Hyphales (Moniliales)
Familia	: Moniliaceae.
Género	: <i>Trichoderma</i>

Fuente: Agrios, 1995

Elaborado: Salazar, 2017

Reproducción

Las especies de *Trichoderma harzianum* se reproducen asexualmente, pueden utilizar una gran variedad de sustratos como fuente de carbono. Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos y líquidos y en un amplio rango de temperatura, son tolerantes a humedades bajas y crecen en suelos ligeramente ácidos.

Morfología de *T. harzianum*

Es un hongo imperfecto que posee hifas hialinas septadas y ramificadas a ambos lados sin ser paralelas, conidióforos, fialides, y conidios; aunque también pueden producir

clamidosporas. Sus estructuras de reproducción son los conidios, mientras que sus estructuras de resistencia son las clamidosporas. Estas son similares a las de otros hongos formadores de clamidosporas, siendo de 5 a 10 veces más grandes que los conidios por sus voluminosas reservas de lípidos; son intercalares o terminales, de forma cilíndrica o globosa (Chávez, 2005).

Los conidióforos son hialinos, al inicio de su desarrollo se observan ramificados, pero cuando maduran comienzan a separarse por su formación aérea, son rectos y pueden llegar a presentar un aspecto piramidal (Figura 3).

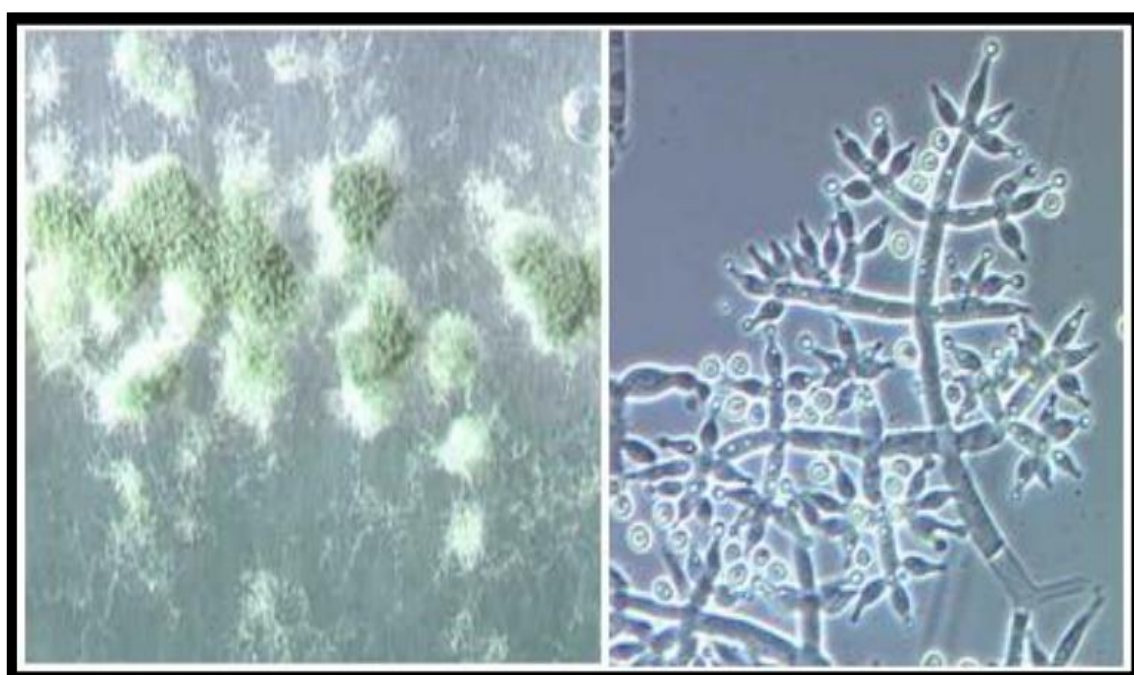


Figura 3. *Trichoderma harzianum*

Elaborado por: Salazar, 2017

Características

T. harzianum se caracteriza porque se desarrolla rápidamente y emite gran cantidad de esporas verdes, ligeramente algodonoso parecido a un moho, de color verde oscuro. *T. harzianum* actúa como bioestimulante de crecimiento radicular promoviendo el desarrollo de las raíces, esto debido a que estimula a la planta a la secreción de fitohormonas, por lo tanto incrementa la masa radicular permitiendo una mejor asimilación de nutrientes y una mayor altura de la planta (ECURED, 2014).

Mecanismo de acción

Infante (2009), menciona que entre los primordiales mecanismos se encuentra la competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y la antibiosis.

- Competencia: constituye un mecanismo de antagonismo muy importante; en la competencia por espacio *T. harzianum* coloniza agresivamente los sustratos y sobrevive en condiciones adversas en forma de clamidiosporas. Posee una velocidad alta de crecimiento, abundante esporulación y puede crecer sobre una amplia gama de sustratos, lo que permite que sea muy eficiente como saprófito y como un agente de control biológico. Compite por nutrientes como nitrógeno, carbohidratos no estructurales y microelementos, este tipo de antagonismo es poco eficaz en sustratos. Además es un excelente competidor por espacio y nutrientes, aunque la competencia depende según la especie.
- Micoparasitismo: se produce un antagonismo entre organismos, las especies de *Trichoderma sp.*, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan y las penetran en momentos, las paredes celulares del hospedante se degradan lo que conlleva al debilitamiento casi total del patógeno. *Trichoderma sp.*, posee un elevado potencial parasítico, lo que le permite parasitar eficientemente las estructuras fúngicas del hongo. El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante (Infante, 2009).
- Antibiosis: según Martínez (2003), las cepas de *T. harzianum* producen metabolitos tóxicos los cuales inhiben el desarrollo de microorganismos sensibles a estos. Una especie de *T. harzianum* produce compuestos antifúngicos que degradan las hifas de *R. solani*, inhiben la germinación de esporas de *Botrytis cinérea*, posee efectos sobre los nematodos. Los antibióticos que produce *T. harzianum* son: tichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Ventajas de *T. harzianum* en agricultura

Es un agente de control biológico, ya que posee un rápido crecimiento y desarrollo. Produce una gran cantidad de enzimas, las cuales se desarrollan con la presencia de hongos

fitopatógenos. Además de desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura.

- Permite el crecimiento de raíces más fuertes y por lo tanto sistemas radiculares más sanos.
- Aumenta la capacidad de captura de nutrientes y de humedad, así como mejora el rendimiento en condiciones de estrés hídrico.
- No requiere equipamiento especial para su aplicación.
- Es compatible con inoculantes de leguminosas y posibilidad de aplicar a semillas que han sufrido un tratamiento fungicida químico.
- Disminuyen y en algunos casos eliminan la necesidad de tratar con fungicida químico, reduciendo costos y el uso de fertilizantes, pues las plantas tienen más raíces y las utilizan mejor (ECURED, 2010).

Beneficios del hongo *T. harzianum* en control biológico

T. harzianum en la sustitución de fungicidas químicos adquiere gran importancia por la reducción directa de residuos tóxicos en los suelos y aguas destinadas para el regadío. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa y positiva, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales.

Unidad formadora de colonias (UFC)

Velásquez et al. (2009), consideran que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una unidad formadora de colonia – UFC.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La aplicación de Tricomplex mejora la calidad del agua de regadío y la microbiología del suelo.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 GENERAL

Determinar la eficiencia de Tricomplex en el tratamiento del agua de regadío y el mejoramiento de la microbiología del suelo.

3.2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar la dosis de Tricomplex adecuada que permita mejorar la calidad del agua de regadío.
- Evaluar la sobrevivencia de Tricomplex en el turno de agua de regadío.
- Identificar el efecto del agua con Tricomplex sobre la vida microbiana del suelo.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO

El presente ensayo se realizó en la florícola Sanna-flowers ubicada en el sector El Progreso de la parroquia Cunchibamba del cantón Ambato, provincia de Tungurahua. La localidad está a una altitud de 2.696 msnm, cuyas coordenadas geográficas son: 01° 43' 00" de latitud Sur y 78° 30' 00" de longitud Oeste (CESA, 2008).

4.2 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

4.2.1 Suelo

MAG (2010), los suelos, de esta zona son suelos de textura franco arcillosa. Los principales productos que se cultivan son hortalizas, papas, zanahoria y pastos. Entre las especies forestales predomina el eucalipto. Por otra parte, la propiedad usa el agua del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato.

4.2.2 Clima y Precipitación

Según los datos de la estación meteorológica de Chachoán (INAMHI, 2010), se registraron valores de: temperatura media anual 16,3°C, humedad relativa 68,0%, precipitación 518,40 mm y velocidad de viento 3,1 m/s, con frecuencia Sur-Este. Dentro de la cubierta plástica la temperatura promedio fue de 26°C y humedad de 88 %.

4.3 MATERIALES Y EQUIPOS

4.3.1 Equipos

Microscopio con cámara
Cámara de flujo

Incubadora
Autoclave
Refrigerador
Destilador de agua
Balanza digital
Tensiómetros
pH- metro
Computador
Impresora
Cámara digital

4.3.2 Materiales de laboratorio

Muestras de agua de regadío
Muestras de suelo agrícola
Producto comercial Tricomplex
Vasos de precipitación
Probetas de 100 ml
Varillas de agitación
Asas
Espátula
Pinzas
Pizetas
Cajas Petri
Placas porta y cubre objetos
Mechero de alcohol
Micropipetas (100 y1000 μ l)
Puntas (amarillas y azules)
Papel parafilm
Frascos ámbar
Frascos de cristal
Fundas plásticas
Termo
Hielos
Papel periódico

Mascarillas

Guantes

4.3.3 Reactivos

Glicerina

Medios de cultivo (XLD Agar Difco)

Medios de cultivo (BBL Levire Eosin Metel Blue Agar)

Buffer

Alcohol

4.3.4 Materiales de campo

Tanques

Macetas

Baldes

Azadón

Palas

Carretilla

Varillas

Tablas

Libreta de campo

Anillados

Carpetas

Esferos distintos colores

Tijeras

Etiquetas

4.4 FACTOR DE ESTUDIOS

Para la presente investigación:

- Dosis de *Trichoderma harzianum* en el tratamiento del agua de regadío.

4.5 TRATAMIENTOS

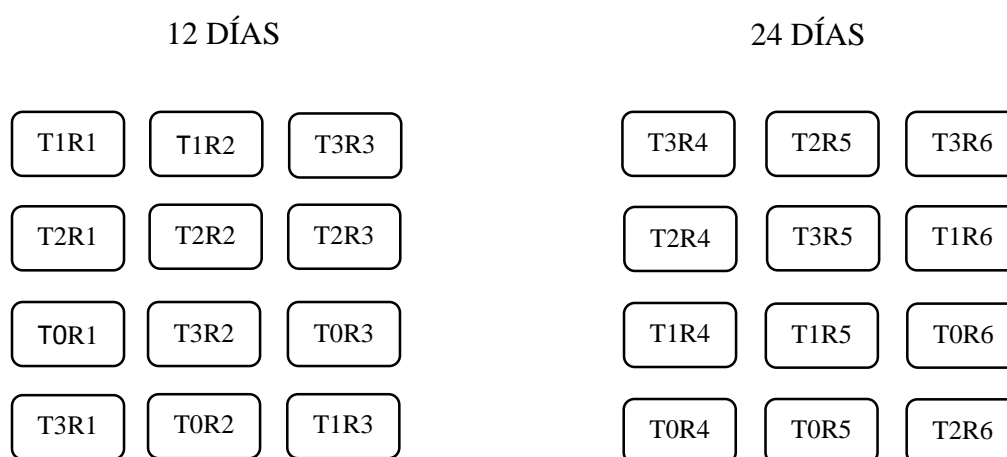
TABLA 4. TRATAMIENTOS AGUA

Tratamiento	Descripción
Tratamiento 1	50 ml Tricomplex / 100 lt de agua de riego
Tratamiento 2	75 ml Tricomplex / 100 lt de agua de riego
Tratamiento 3	100 ml Tricomplex / 100 lt de agua de riego
Testigo	Agua de riego

Elaborado por: Salazar, 2017

4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones, se realizó una prueba de Tukey para analizar diferencias de medias entre tratamientos.



4.7 VARIABLES RESPUESTA

4.7.1 Primera toma de muestras de agua

Se realizó una toma de muestra de agua de riego previo a la instalación del ensayo, en la captación de ingreso del agua de riego a la florícola Sanna-Flowers, se

utilizaron dos botellas (una color ámbar y una transparente) de 1 litro de capacidad, etiquetas, guantes y un maletín.

4.7.2 Reconocimiento, colocación de tanques de 100 litros e inoculación de *T. harzianum* (Tricomplex)

Producto comercial Tricomplex

Propiedades: es una mezcla de varias especies de hongos antagonistas del genero *Trichoderma*: *T. harzianum* (Th), *T. koningii* (Tk), *T. viride* (Tv), *T. hamatum* (Th). Los cuales han demostrado ser eficientes para el control de un amplio rango de enfermedades tanto de las porciones aéreas como las subterráneas y además situaciones de estrés abiótico.

- Regulador de poblaciones de hongos fitopatógenos.
- Recuperador metabólico.
- Compensador de biomasa.
- Inductor natural de resistencia.
- Promovedor productivo.
- Atenuador de estrés biótico o abiótico.

Nombre común: Biofunguicida bioquímico, regulador de poblaciones de fitopatógenos.

Formulación: Líquido soluble.

Concentración: conidias viables (CV) ml de producto $3 - 4 \times 10^{10}$; Trichoderminas α - θ , Gliotoxinas, Phytohormon Analogs (PA), Oligoelementos.

Compatibilidad: es compatible con la mayoría de herbicidas, insecticidas, defoliantes, fertilizantes foliares, reguladores de crecimiento, no expresa ningún nivel de fitotoxicidad a nivel citoplasmático o a nivel de tejido. Se deben aplicar separadamente sustancias altamente alcalinas, o de pH extremadamente ácido. No mezclar con biopesticidas cuyo ingrediente activo sean bacterias.

Reconocimiento

- En Plantsphere Laboratories del grupo BIONIKA, se elaboró el producto comercial Tricomplex que es un biofunguicida, regulador de fitopatógenos con una concentración de $(3.5 * 10^{10})$ de cepas vivas y metabolitos secundarios como Trichoderminas, utilizado en el presente ensayo.

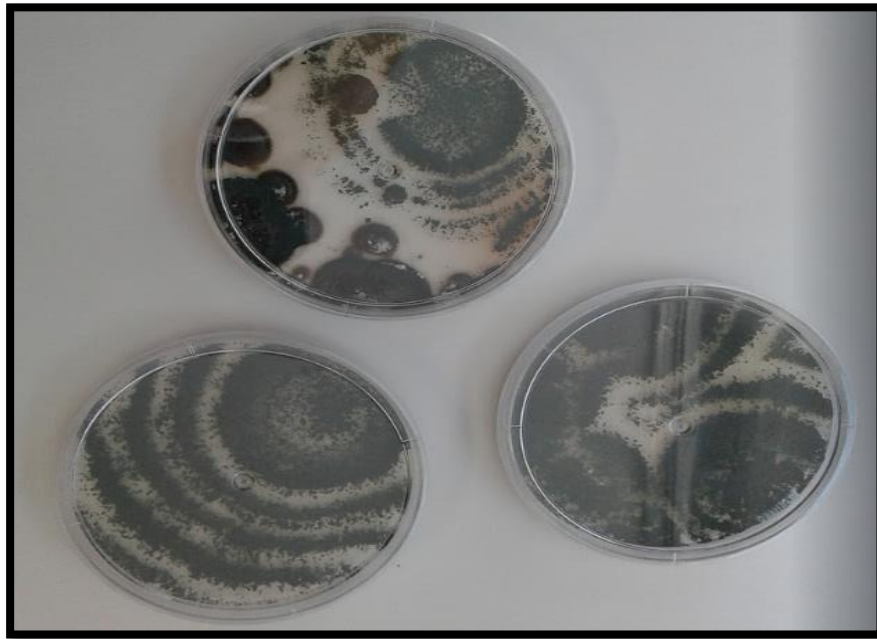


Figura 4: Cepas de *Trichoderma harzianum*.

Elaborado por: Salazar, 2017

Colocación de tanques

- Se colocaron cuatro tanques de 100 l. con agua de regadío que se tomó de la captación de ingreso a la florícola Sanna-Flowers.

Inoculación de *Trichoderma harzianum*

- Se utilizaron tres dosis de Tricomplex (50 ml, 75 ml y 100 ml) que se inocularon en los tanques antes mencionados, se etiquetaron y taparon por precaución para evitar el ingreso de agentes externos.



Figura 5: Inoculación de *Trichoderma harzianum*

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.3 Segunda toma de muestras de agua más *Trichoderma harzianum*

Transcurridos tres días de la inoculación del *T. harzianum* (Tricomplex) en los tanques se procedió a tomar muestras de cada uno de ellos, para su análisis en Plantsphere Laboratories del grupo BIONIKA, con el fin de identificar si el *T. harzianum* (Tricomplex) se había diseminado y por ende mejorado su calidad para el uso.

4.7.4 Preparación y primera toma de muestra de suelo

Se prepararon 60 kg de suelo de las camas picadas de la florícola, logrando obtener una homogeneidad, se tomó 1 kg de muestra para realizar el respectivo análisis físico-químico y fitopatológico.

4.7.5 Colocación de sustrato en macetas

Se prepararon 24 macetas de plástico con una capacidad de 2,5 kg de 40 cm de alto y 16 cm de ancho (Figura 6), se llenaron con el sustrato elaborado y se dispusieron

de acuerdo al diseño. Se regaron hasta conseguir que el suelo este a capacidad de campo y para su control se utilizaron tensiómetros de 35 cm (Figura 12).



Figura 6: Colocación de macetas y tensiómetro

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.6 Inoculación de *Trichoderma harzianum* (Tricomplex)

A los 6 días de haber inoculado el agua se tomó un litro para los tratamientos, y se regaron las macetas con el fin de mejorar la vida microbiana del suelo; se calculó la infiltración, durante una hora, con el uso de una probeta de 100 ml, obteniéndose un promedio de infiltración de 150 ml por maceta.

4.7.7 Segunda toma de muestras de suelo más *Trichoderma harzianum* (Tricomplex)

Transcurridos seis días de la inoculación de *Trichoderma harzianum* (Tricomplex) en las macetas con sustrato, se realizó la primera toma de 12 muestras, utilizando fundas, guantes y etiquetas, para enviarse al laboratorio para el análisis fitopatológico y específico de *Trichoderma harzianum*, para establecer si se mejoró la vida microbiana del suelo. (Figura 7).



Figura 7: Muestra de suelo (14 días)

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.8 Tercera toma de muestras de suelo más *Trichoderma harzianum* (Tricomplex)

Transcurridos 24 días de la primera inoculación se realizó la segunda toma de muestras en las 12 macetas restantes y se enviaron al laboratorio para el respectivo análisis de la vida microbiana del suelo. (Figura 8)



Figura 8: Muestras de suelo (24 días)

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.9 Protocolo y preparación de medios

Preparación de medios EMB (Levine Eosina Methylene Blue) y XLD (Xylose, Lysine, Desoxycholate)

- Para preparar 500 ml de medio de cultivo EMB, pesar 18.7 g de medio en la balanza analítica.
- Para preparar 500 ml de medio de cultivo XLD, pesar 28.5 g de medio en la balanza analítica.
- Para ambos medios medir en una probeta 500 ml de agua destilada
- En una estufa disolver ambos medios y posteriormente auto clavar en botellas BOECO de 500 ml.
- Dispensar aproximadamente 20 ml de medio de cultivo en cada caja Petri y dejar enfriar.

Siembra en medios de cultivo y disoluciones

- En cada caja Petri colocamos 150 μL del inóculo del control y tratamientos.
- Realizamos diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) del control y tratamientos. (Figura 9) Posteriormente sembramos en cajas Petri la dilución 10^{-2} y 10^{-3} .

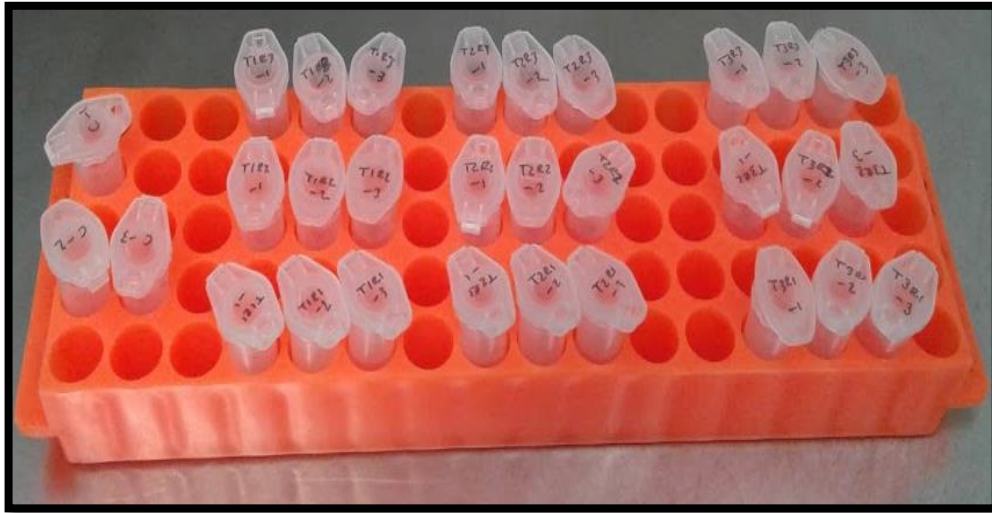


Figura 9: Disoluciones con buffer

Elaborado por: Salazar, 2017

- Incubamos a 25°C por 24, 48 y 72 h. (Figura 10)



Figura 10: Incubación

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.10 Metodología de análisis microbiológico de suelos

Para el tratamiento de cada una de las muestras se utilizó la técnica de recuento por dilución, esta nos permite un doble objetivo: el aislamiento de colonias y el recuento de los microorganismos que tenemos en el cultivo inicial.

- Se pesan 10 g de suelo que son colocados en un Erlenmeyer que contiene 90 ml de agua destilada estéril, se agita por 20 minutos y se procede a realizar el sistema de diluciones, para lo cual se utilizan seis tubos con 9 ml agua destilada estéril.
- Mediante una pipeta estéril se toma 1 ml del cultivo mixto y deposita en el primer tubo. Agitar hasta conseguir una suspensión homogénea.
- Tomar otra pipeta estéril y de este primer tubo transferir 1 ml al segundo tubo, agitar y repetir la operación transfiriendo 1ml del segundo al tercer tubo, del tercero al cuarto y del cuarto al quinto.
- Una vez realizado el banco de diluciones procedemos a sembrar los cinco últimos tubos (diluciones 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6), con un ml en placas de papa dextrosa agar, mediante la técnica de placa pobre.
- Se deposita un ml de la dilución correspondiente en una caja Petri estéril y sobre ella se vierte el medio de cultivo, se agita y se deja solidificar el medio; se incuban las cajas a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 a 72 horas hasta el apareamiento de las colonias.
- El recuento de las colonias se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ufc / g de suelo} = N \times D$$

Fuente: Pesantez 2016

Elaborado por: Salazar 2017

Donde:

- ufc = unidades formadoras de colonias
- D = dilución

- N = número de colonias

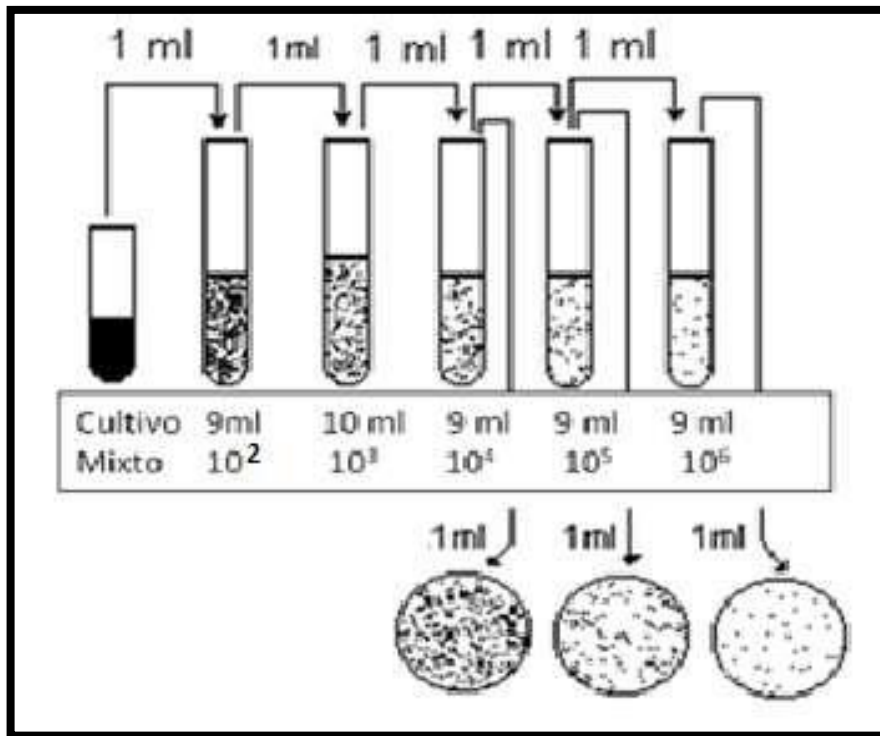


Figura 11: Protocolo de análisis de suelos

Elaborado por: Salazar, 2017

4.7.11 Metodología de análisis e identificación de *Trichoderma harzianum*

- Se pesan 10 g de suelo que son colocados en un Erlenmeyer que contiene 90 ml de agua destilada estéril, se agita por 20 minutos (suspensión madre), se toma 1 ml y se coloca en una caja Petri estéril.
- Sobre esta se vierte el medio selectivo *Trichoderma* (medio T) que está constituido por ácido cítrico, nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio y cloruro de calcio, para dejarlo solidificar (caja madre).
- Con la ayuda de un sacabocados se procede a picar toda la superficie de la caja madre y los círculos obtenidos son colocados en 3 cajas Petri que contienen el medio T ya solidificado, colocando de 25 a 30 por cada caja.
- Se incuban a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días a oscuridad y posteriormente dos días a la luz, al término se procede a contar las colonias características del microorganismo

sobre cada uno de los círculos y la población existente se determina con la siguiente fórmula:

$$x = \frac{n * D^2}{ps * d^2} * 200$$

Fuente: Pesantez 2016

Elaborado por: Salazar 2017

Donde:

- x = población
- n = promedio de número de colonias por círculo
- D = diámetro de la caja Petri
- d = diámetro del círculo
- ps = peso seco del suelo

4.8 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

La información obtenida fue procesada en el programa estadístico INFOSTAD. En el cual se efectuaron Análisis de Varianza (ADEVA), también se realizaron pruebas de significación de Tukey.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Efecto de *Trichoderma harzianum* (Tricomplex) en el agua

Los resultados de las variables agronómicas evaluados en los tratamientos del efecto del agua con *T. harzianum* (Tabla 6). El índice de bacterias en el agua como *E. coli* es de $1.95 \pm$ ufc en el (T0) mientras que transcurridos 72 horas se reporta un decrecimiento de $0.035 \pm$ ufc en el (T3), (Figura 12) se observa un decrecimiento de *E. coli*, para lo cual se ha verificado con Higuera, *et al.*, (2010) manifiestan que dicha bacteria al verse atacada por un agente externo baja sus niveles de población para protegerse.

Es así que Piedra, *et al.*, (2016) demuestran estudios realizados en la mayoría de aguas de mala calidad y abonos orgánicos sin previo tratamiento, es un factor de contaminación por *E. coli*, demostraron también que en hortalizas se presenta un alto índice de contaminación por dicha bacteria, a consecuencia de riego con agua contaminada con materia fecal, omisión o desconocimiento de las condiciones sanitarias básicas de manipulación.

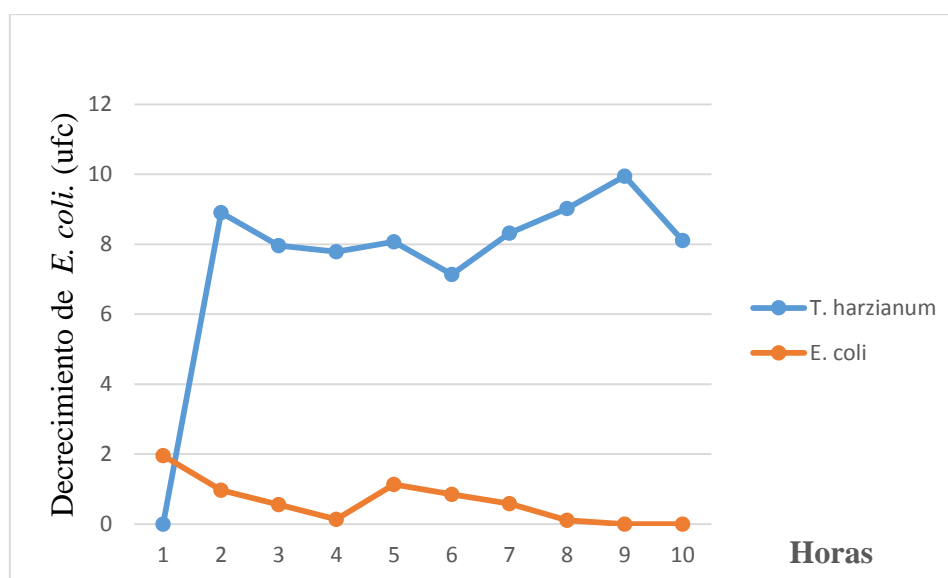


Figura 12 Efecto del agua saneada con *T. harzianum* sobre *E.coli*

Elaborado por: Salazar, 2017

En la variable de *Klebsiella* sp a las 24 horas se pudo reportar $1.49 \pm$ ufc en (T0), mientras que transcurridas las 72 horas, $0.97 \pm$ ufc en el (T3), indicándonos el decrecimiento de dicha bacteria sin embargo Falconí (2010) menciona que son conocidas como bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, que en asociación en el suelo para realizar procesos de fijación de nitrógeno. (Figura 13) se explica cómo *T. harzianum* se reproduce en mayor cantidad y baja los niveles de dicho patógeno considerado como patógeno oportunista.

De ahí que Abud et al., (2013) manifiesta que el uso de agua de canales contaminados con coniformes totales y fecales es un riesgo para la salud, dicha bacteria que no afectan directamente al hombre, utiliza hospederos intermediarios a animales domésticos o en asociación con otros que son del grupo de coniformes

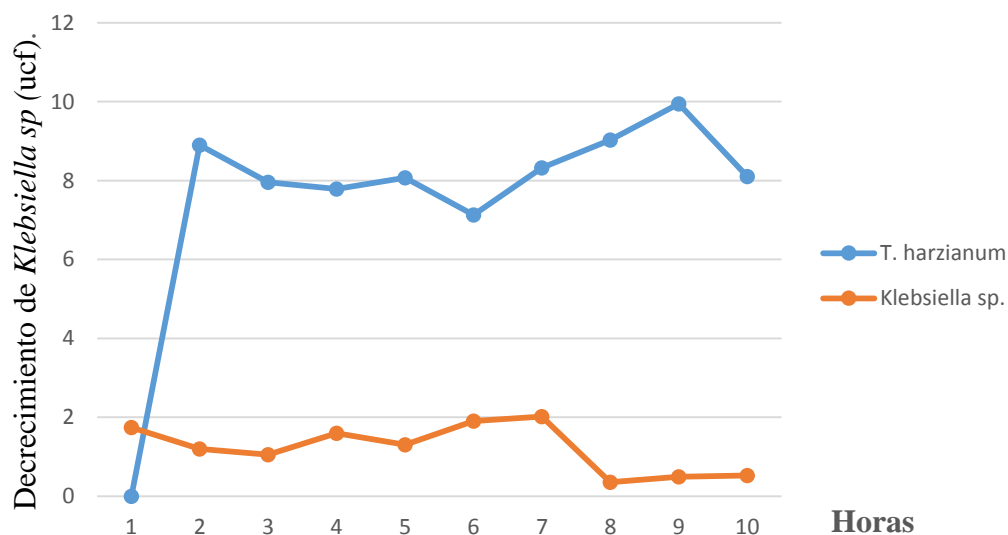


Figura 13 Efecto de *T. harzianum* sobre *klebsiella* sp.

Elaborado por: Salazar, 2017

Con respecto a la variable de *Salmonella* sp a las 24 horas se pudo reportar $2.95 \pm$ ufc en (T0), mientras que transcurridas las 72 horas, $0.08 \pm$ ufc en el (T3), indicándonos el decrecimiento de dicha bacteria, para lo cual comparando con López, et al., (2009) señala que es un grupo de bacterias patógenas Gram negativas presentes en canales de uso agrícola ya que estaos tienen diferentes captaciones de aguas residuales lo que hace que dicha bacteria se disemine con facilidad, está presente en el intestino de los animales y que al estar en contacto con los cultivos produce enfermedades. (Figura 14) se explica la efectividad del

(T3) con *T. harzianum*, comprobando la efectividad de hongo, bajando los niveles de dicha bacteria Gram negativa.

Mientras que la FAO (2010) manifiesta que la presencia de coniformes suele ser superior a la que está permitida por la normativa general del estado.

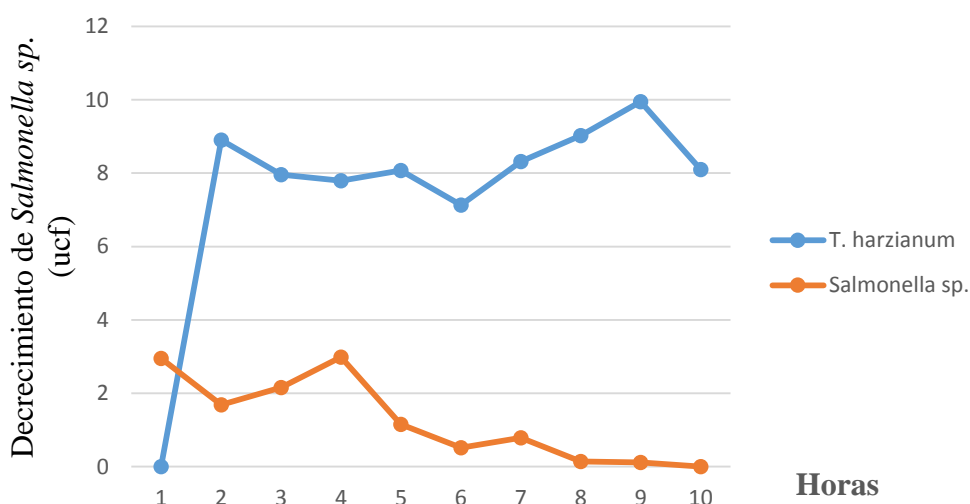


Figura 14 Eficiencia de *T. harzianum* sobre la bacteria *Salmonella sp*

Elaborado por: Salazar, 2017

Los resultados de la variable de *B. subtilis* a las 24 horas se pudo reportar $0.38 \pm$ ufc en (T0), mientras que transcurridas las 72 horas, $4.56 \pm$ ufc en el (T3), indicándonos proliferación de dicha bacteria, evidenciando que Higuera, *et al.*, (2010) en su investigación manifiesta que la asociación simbiótica del hongo-bacteria se dan en el suelo, mientras que en el ensayo se evidencio en el agua de regadío, evidenciando el desarrollo de *B. subtilis*, que es una bacteria benéfica, por otra parte Reinoso, *et al.*, (2006) en su investigación señala que las especies del genero *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico.

Su utilización para el biocontrol, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica. *B. subtilis* tienen un rápido crecimiento en un medio líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico. (Figura 15) se explica la asociación de *T. harzianum* con *B. subtilis*. y sus crecimientos a la par.

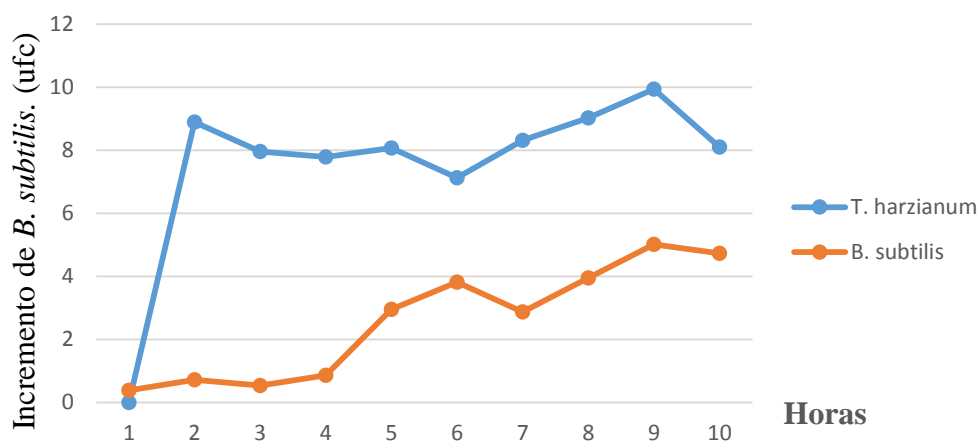


Figura 15 Influencia de *T. harzianum* sobre *B.subtilis*.

Elaborado por: Salazar, 2017

Con respecto a la variable de *Proteus* sp a las 24 horas se pudo reportar $2.18 \pm$ ufc en (T1), mientras que transcurridas las 72 horas, $1.87 \pm$ ufc en el (T3), indicándonos un decrecimiento no tan favorable de dicha bacteria, como complemento Falconí (2010) manifiesta que es una bacteria Gram negativa, anaeróbica en forma de bastón. Se distribuye sin problema en suelo y agua. (Figura 16) se explica la efectividad del (T3) con *T. harzianum*, bajando relativamente las poblaciones de mencionado hongo al sanear el agua de regadío.

Al igual que Jacobsen, *et al.*, (2008) da a conocer en su trabajo de investigación que hay microorganismos capaces de degradar los colorantes azoicos, entre ellos *Proteus* sp. En condiciones aeróbicas la mayoría de colorantes azoicos no son degradables por bacterias sin embargo bajo condiciones anaeróbicas se logra degradar la molécula del tinte.

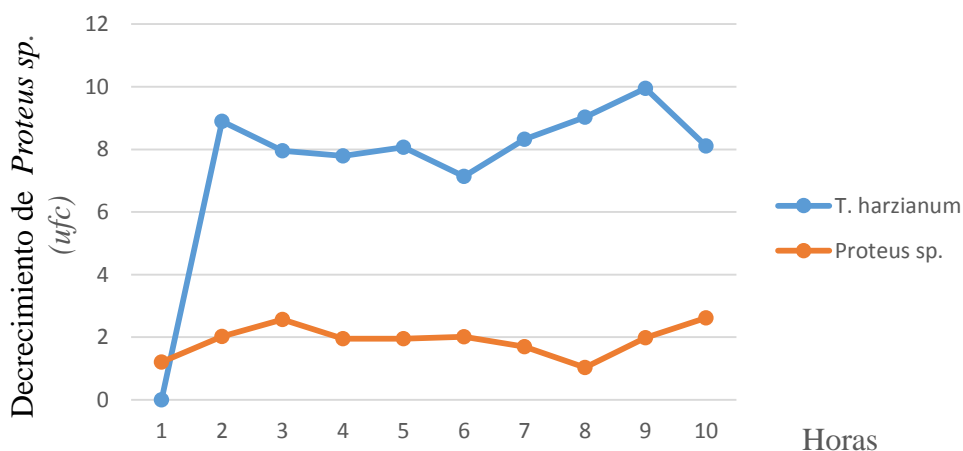


Figura 16 Desarrollo de *T. harzianum* sobre *Proteus* sp.

Elaborado por: Salazar, 2017

Con respecto a la variable de *Chromartium* sp a las 24 horas se pudo reportar $2.08 \pm$ ufc en (T0), mientras que transcurridas las 72 horas, $0.04 \pm$ ufc en el (T3), indicándonos el decrecimiento de dicha bacteria, donde Falconí, (2010) manifiesta que es una bacteria fotosintética de azufre, no suelen ser muy dañinas para los cultivos pero está considerada dentro del grupo de los coniformes, (Figura 17) se evidencia la efectividad del (T3) con *T. harzianum*.

Así como Dasgupta, *et al.*, (2010) señala que *Chromartium* sp es una bacteria fotosintética que exhiben altas capacidades de producción de hidrógeno, por lo tanto sería muy adecuada para la aplicación en un sistema de cultivo.

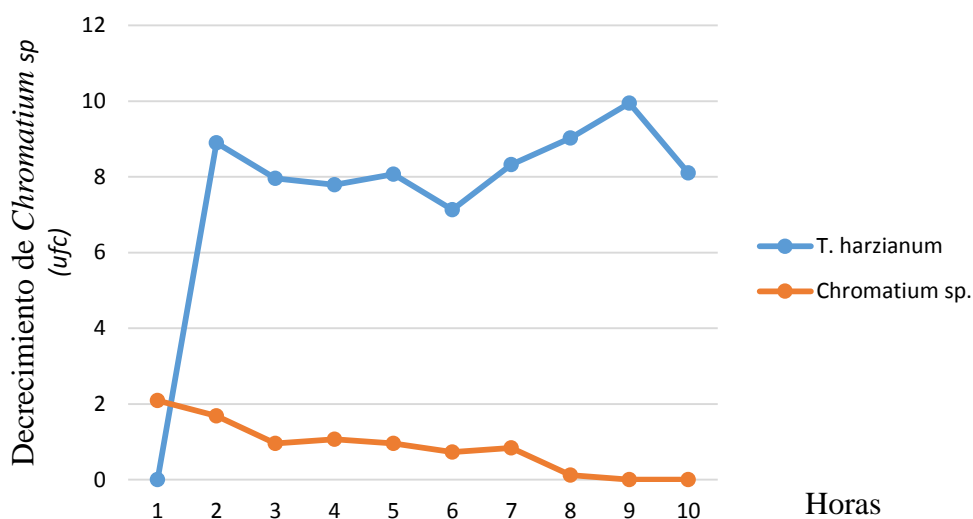


Figura 17: Influencia de *T. harzianum* sobre *Chromartium* sp.

Elaborado por: Salazar, 2017

5.2 Efecto del agua tratada con *Trichoderma harzianum* sobre la vida microbiana del suelo

Los resultados de las variables agronómicas evaluados en los tratamientos del efecto del agua con *T. harzianum* en suelo (Tabla 5). Las bacterias a los 14 días en el suelo ($P < 0,0016$), presentaron un valor mayor a razón de 7,11 ufc en el tratamiento (T3), y a los 24 días bacterias ($P > \text{valor } 0,4357$), presentaron un valor mayor a razón de 8,0 ufc en el tratamiento (T3). Al respecto, Falconí (2010), señala que debido a la adaptabilidad y a los metabolitos que genera *T. harzianum*, hacen que los microorganismos del suelo se activen; a más que el

suelo de la florícola presenta una tendencia alcalino pH (7) ideal para el desarrollo de bacterias.

En la variable *Rhizoctonia sp.* a los 14 días ($P < \text{valor } 0,0131$) se reporta un valor a razón de 0,0 ufc en el tratamiento (T3), y a los 24 días *Rhizoctonia sp.* ($P > \text{valor } 0,6026$), presenta un valor mayor 0,67 ufc en el tratamiento (T3); sobre la dinámica de este hongo corrobora Falconí (2010), que el suelo por acción del *T. harzianum* no presenta condiciones de baja temperatura y alta humedad, que son favorables para que el patógeno se pueda desarrollar y se disemine.

Con relación a la variable *Penicillium sp.* a los 14 días ($P > \text{valor } 0,1972$), nos demuestra un valor mayor a razón de 6,26 ufc para el tratamiento (T2), mientras que a los 24 días *Penicillium sp.* ($P < \text{valor } 0,1010$) presenta un valor de 3,83 ufc (T2); para lo cual De Lucca (2007), señala que el hongo aumenta la población debido a que el tratamiento presenta una acción más favorable sobre este hongo hasta los 15 días de aplicado el tratamiento; adicionalmente el hongo ayuda en los procesos de movilización de fósforo en el suelo, manifestando su acción en beneficio del cultivo.

Los resultados con respecto *Aspergillus sp.* a los 14 días ($P > \text{valor } 0,9296$), nos demuestra un valor mayor a razón de 2,0 ufc en el tratamiento (T0), mientras que a los 24 días *Aspergillus sp.* ($P < \text{valor } 0,3966$) presenta un valor de 1,1 ufc en el tratamiento (T3); para el caso de este hongo, De Lucca (2007), señala que es conocido por su acción solubilizadora de fosfatos y permanece cercano a las raíces, pero al no tener plantas a su alrededor decrece su población y se mantiene latente en el suelo.

Los resultados con relación *Alternaría sp.* a los 14 días ($P < \text{valor } 0,0277$), demuestran un valor mayor a razón de 5,0 ufc en el tratamiento (T0), mientras que a los 24 días *Alternaría sp.* ($P < \text{valor } 0,2892$) presenta un valor de 0,0 ufc con el tratamiento (T3), a lo cual Falconí (2010), acota que por estar *T. harzianum* en mayor cantidad de colonias en el suelo, provoca que *Alternaría sp.* active su mecanismo de defensa bajando su población y actividad en el suelo, manteniéndose inactivo.

Con relación a la variable *Fusarium* a los 14 días ($P > \text{valor } 0,2013$) presenta un valor mayor a razón de 2,33 ufc para el tratamiento (T1), mientras que a los 24 días *Fusarium sp.* ($P < \text{valor}$

0,0087) presenta un valor de 0,0 ufc con el tratamiento (T3); al respecto, Falconí (2010), señala que *T. harzianum* ha logrado reproducirse y por ende formar un mayor número de colonias en el suelo, provocando al igual que *Alternaria*, que *Fusarium* active su mecanismo de defensa disminuyendo su población y su efecto en el suelo, permaneciendo latente

TABLA 5. Desempeño De Las Variables Agronómicas Bacterias Y Hongos En Suelo

VARIABLES	TRATAMIENTOS				C.V ²	E.E	p-VALOR
	T0 ¹	T1 ²	T2 ³	T3 ⁴			
Bacterias 14 días	5,48 ^c	6,11 ^{bc}	6,69 ^{ab}	7,11 ^a	5,24	0,19	0,0016
Bacterias 24 días	7,78 ^a	7,23 ^a	7,21 ^a	8,0 ^a	8,98	0,39	0,4357
<i>Rhizoctonia sp.</i> 14 días	3,00 ^b	1,43 ^{ab}	0,67 ^a	0,00 ^a	66,75	0,49	0,0131
<i>Rhizoctonia sp.</i> 24 días	0,00 ^a	1,33 ^a	1,10 ^a	0,67 ^a	161,90	0,72	0,6.26
<i>Penicillium sp.</i> 14 días	3,30 ^a	4,75 ^a	6,26 ^a	3,10 ^a	41,63	1,05	0,1972
<i>Penicillium sp.</i> 24 días	3,30 ^a	5,13 ^a	3,83 ^a	4,49 ^a	19,26	0,47	0,1010
<i>Alternaría sp.</i> 14 días	5,00 ^b	1,33 ^{ab}	0,00 ^a	1,33 ^{ab}	85,20	0,94	0,0277
<i>Alternaría sp.</i> 24 días	2,00 ^a	0,67 ^a	0,67 ^a	0,00 ^a	142,83	0,69	0,2892
<i>Aspergillus sp.</i> 14 días	2,00 ^a	2,36 ^a	3,00 ^a	3,00 ^a	86,86	1,30	0,9296
<i>Aspergillus sp.</i> 24 días	3,48 ^a	2,43 ^a	2,43 ^a	1,10 ^a	67,49	0,92	0,3966
<i>Fusarium sp.</i> 14 días	0,00 ^a	2,33 ^a	2,33 ^a	0,77 ^a	106,88	0,84	0,2013
<i>Fusarium sp.</i> 24 días	2,00 ^b	1,33 ^{ab}	2,26 ^b	0,00 ^a	44,31	0,36	0,0087

^{a-c} Medias en la fila seguida de las letras diferentes indican diferencias estadísticas

¹T0, ²T1, ³T2, ⁴T3: Tratamientos. ²C.V.: coeficiente de variación.

Elaborado por: Salazar, 2017.

Tabla 6: Tabla de homogeneidad de pruebas de Tukey en muestras de agua

Tratamientos	Grupo de microorganismos						
	* <i>E. coli</i>	* <i>Klebsiella</i> sp.	* <i>Salmonella</i> sp.	<i>B. subtilis</i>	* <i>Proteus</i> sp.	* <i>Chromatium</i> sp.	<i>Trichoderma harzianum</i>
T0	1.95±a	1.49±	2.95± a	0.38± b	1.20± a	2.08± a	0± b
T1	0.55±0.41ab (0.13-0.96)	1.33±0.10 (1.24-1.44)	2.27± 0.65a (1.68-2.98)	0.70± 0.16b (0.53-0.86)	2.18±0.33a (1.95-2.56)	1.23±0.3914a (0.95-1.68)	8.21± 0.5973a (7.79-8.89)
T2	0.85± 0.27ab (0.57-1.13)	1.49±0.13 (1.34-1.58)	0.82± 0.31ab (0.52-1.15)	3.21±0.524a (2.87-3.81)	1.88± 0.16a (1.69-2.01)	0.84± 0.1122ab (0.73-0.95)	7.84± 0.6266a (7.13-8.32)
T3	0.035± 0.06b (0.0-1.95)	0.97±0.04 (0.92-1.01)	0.08± 0.07b (0.00-0.14)	4.56±0.55a (3.95-5.01)	1.87± 0.79a (1.02-2.61)	0.04± 0.07b (0.00-0.12)	9.02±0.9219 a (8.10-9.94)
C.V ² (%)	13.66	11.26	11.26	10.91	10.91	8.23	9.70
p-VALOR	0.0088	0.0007	0.0007	0.4608	0.4608	0.0005	0.0002

Valores promedio en una columna seguidos de la misma letra no muestran diferencias significativas según prueba de Medias de Tukey (p< 0,01).

²C.V: coeficiente de variación. *Datos transformados $y = \sqrt{x + 0.5}$

Elaborado por: Salazar, 2017

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1 CONCLUSIONES

Altos índices de eficiencia de *Trichoderma harzianum*, en el producto comercial Tricomplex, producción de un metabolito secundario llamado Trichodermina que facilita diseminación de *T. harzianum* en el agua con mayor número de colonias, a más de tener una acción estimuladora en microorganismos eficientes como *Basillus subtilis*, mejorando la vida microbiana benéfica del suelo.

La dosis más adecuada de Tricomplex (*Trichoderma harzianum*) es 100ml por litro de agua, utilizada en el tratamiento 3, nos permitió sanear el agua de regadío bajando los niveles de Enterobacterias como: *klebsiella*, *Proteus sp.*, *Salmonella*, al mismo tiempo, *T. harzianum* y *Basillus subtilis* se diseminaron en el agua con un mayor número de colonias.

Evaluando la sobrevivencia de *Trichoderma harzianum*.; en el ensayo se registraron datos a las 24, 48, 72 horas, se observó un incremento de *T. harzianum*, teniendo un mayor desarrollo de colonias en el agua a las 48 horas mientras a las 72 horas se observó que *T. harzianum* se queda inmóvil en el agua debido a la disminución de fuente de alimentación.

El efecto que tiene el agua con *Trichoderma harzianum* en el suelo es la diseminación positiva, debido a que su presencia disminuye los índices de microorganismos patógenos, como el complejo Enterobacterias y de hongos fitopatógenos, que están presentes en la mayoría de suelos y agua de riego de la provincia de Tungurahua y que decrecen con la aplicación de Tricomplex que tiene en su composición *Trichoderma harzianum*.

6.2 BIBLIOGRAFÍA

- Abud, Y. C., Trujillo, M. M., & Medina, E. A. (2013). Uso de bacterias indicadoras de contaminación en el análisis del agua de riego de los cultivos de la población de Uruétaro, Michoacán. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 9(1), 115-121.
- Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, DF. Editorial Limusa. 834 p.
- Asaho, H. 2012. Supervivencia de *Clavibacter michiganensis*, agente causal del "Cancro bacterinao del Tomate". Buenos Aires, Argentina.
- Argumedo, R., Alarcón, A., Ferrera, Peña, J. 2009. El Género Fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista internacional de contaminación ambiental. From: [Http://Www.Scielo.Org.Mx/SciELO.Php?Pid=S0188-49992009000400006&Script=Sci_Arttext&Tlng=Pt](http://www.Scielo.Org.Mx/SciELO.Php?Pid=S0188-49992009000400006&Script=Sci_Arttext&Tlng=Pt)
- Arroyo, M., Quesada, J., Quesada, R., Geocisa, J. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México*.
- Bell, S., Hernández, F., Terry, A. 2009. Identificación De Algunas Especies De Microorganismos Benéficos En La Rizosfera De Gerbera . La Habana, Cuba, Cuba.
- Cano, M. 2011. Interacción De Microorganismos Benéficos En Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* Spp. y *Pseudomonas* Spp. Una Revisión. REVISTA U.D.C.A ACTUALIDAD Y DIVULGACIÓN CIENTÍFICA. From En: [Http://Www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Pid=S012342262011000200003&Script=Sci_Arttext&Tlng=En](http://www.Scielo.Org.Co/SciELO.Php?Pid=S012342262011000200003&Script=Sci_Arttext&Tlng=En)
- Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas (CESA). 2008. El Riego y la Producción Agrícola en la Provincia de Cotopaxi. CESA, PDA Pujilí, Swissair, Codereco. Cotopaxi-Ecuador. 16p.

- Consejo Nacional de Recursos Hídricos (CNRH). 2002. Proyecto Piloto para el Manejo Integral del Recurso y Tratamiento de Aguas Servidas en la Cuenca del Río Cutuchi. CNRH, Codereco, Cohiec. 29p.
- Chávez, A., McDonald, J. 2005. Uso práctico de microorganismos eficientes. Editorial ACCS; Extensión Agropecuaria.
- Dasgupta, C. N., Gilbert, J. J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S. A., Skjanes, K., & Das, D. (2010). Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10218-10238.
- De Lucca, A. J. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Revista iberoamericana de micología*, 24(1), 3.
- FAO. ORG. (2010). Norma De Calidad Ambiental Y De Descarga De Efluentes: Recurso Agua.
- Falconí C. (2010). Manual de Taxonomía de *Trichoderma harzianum*. Microorganismos Agrícolas ecuatorianos.
- Espinosa, R. 2013, Evaluación de tres cepas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium Oxysporum* en el cultivo de maracuyá (*Passiflora Edulis* Var *Flavicarpa*).
- ECURED. 2014. *Trichoderma* spp. Obtenido de Conocimiento con todos y para todos ECURED: http://www.ecured.cu/index.php/Trichoderma_spp.
- Ezziyani, M., Sanchez, C. 2004, *Trichoderma Harzianum* Como Biofungicida Para El Biocontrol De *Phytophthora Capsici* En Plantas De Pimiento (*Capsicum Annuum* L.
- Garbisu, C., Amézaga, I., y Alkorta, I. (2002). Biorremediación y ecología. *Revista Ecosistemas*, 11(3).

- Gobierno Provincial de Tungurahua. (2014). Plan provincial de riego de Tungurahua.
- Guerron, G. 2013, Respuesta del suelo y del cultivo de tomate hortícola (*Solanum esculentum mil*) a la aplicación de lactofermentos enriquecidos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cevallos, Ec.
- SENAGUA. (2011). Calidad de agua en el Ecuador.
- Infante, D. 2009, Mecanismos De Acción De *Trichoderma* frente A Hongos Fitopatógenos.
En: [Http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1010-27522009000100002](http://Scielo.Sld.Cu/Scielo.Php?Script=Sci_Arttext&Pid=S1010-27522009000100002)
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). 2010. Datos de la estación meteorológica de Chachoán, Ambato, Ec.
- Jacobsen, SM, Stickler, DJ, Mobley, HLT y Shirtliff, ME (2008). Infecciones del tracto urinario asociadas a catéter complicadas debidas a *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*. *Revisiones de microbiología clínica* , 21 (1), 26-59.
- Kurioka, M., Martirena, V., y Mulvany Gastellu, W. J. C. (2013). Evaluación de metabolitos inducidos en plantines de *Eucalyptus grandis* y *E. globulus* creciendo en vivero sobre sustrato inoculado con *Trichoderma Harzianum*.
- Lara, B. 2010, “Depuración de Aguas Residuales Municipales con Humedales Artificiales”. Máster en Ingeniería y Gestión Ambiental. Barcelona-España. ,114p.
- López Cuevas, O., León Félix, J., Jiménez Edeza, M., & Chaidez Quiroz, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista fitotecnia mexicana*, 32(2), 119-126.
- Martínez, A, Villacís, L. 2002. Evaluación del bioactivador del suelo (Bioway), acolchados y microtúneles para el cultivo de la fresa (*Fragaria vesca L. Var. oso grande*), en la

zona de Huachi. Tesis Mag. Querocha Ecuador. Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica. 55 p.

Méndez, A. A. C., Carmona, G. M., y Ortiz, L. J. P. Disminuir El Uso Excesivo De Agroquímicos. En.

http://www.icuap.buap.mx/docs/revista_seis/articuloslargos/trichodermaspp.pdf

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG, Ec). 2010. Centro de información tecnológica ambiental

Pesántez, M., y Castro, R. (2016). Potencial de cepas de *Trichoderma* spp. para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. *Biotechnología Vegetal*, 16(4).

Piedra Vargas, J. J., Gallegos Robles, M. A., Salazar Sosa, E., García Hernández, J. L., Trejo Escareño, H. I., & Orona Castillo,(2016) I. Estado De Inocuidad Del Sistema Productivo De Tomate (*Lycopersicum Esculentum* Mill) En Relación A La Presencia De *Escherichia coli* O157: H7.

Pozo C. 2012, Preservar y controlar la calidad de agua, Consejo Provincial, los Municipios y el Ministerio del Ambiente.

Reinoso Pozo, Y., Casadesús Romero, L., García Suárez, A., Gutiérrez Pérez, J., & Álvarez-Rivera, V. P. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, 10(3).

Rojas-Higuera, N., Sánchez-Garibello, A., Matiz-Villamil, A., Salcedo-Reyes, J. C., Carrascal-Camacho, A. K., & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2010). Evaluación de tres métodos para la inactivación de coliformes y *Escherichia coli* presentes en agua residual doméstica, empleada para riego. *Universitas Scientiarum*, 15(2).

Saval, S. (1997). Biorremediación como alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos. In *Congreso nacional de ingeniería sanitaria y ciencias ambientales*, 11 (pp. 284-291). FEMISCA.

Vallejo, T. (2014). Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio. Universidad Técnica de Ambato.

Vásquez, M., Guerrero, J., Quintero, P. 2010. Biorremediación De Lodos Contaminados Con Aceites Lubricantes Usados. Revista internacional de contaminación ambiental. En: [Http://Www.Scielo.Org.Co/Pdf/Biote/V12n1/V12n1a14.Pdf](http://Www.Scielo.Org.Co/Pdf/Biote/V12n1/V12n1a14.Pdf)

Velásquez, O., Ortegón, A., Camacho, A., Giles, M., Palao, M., y Serrano, B. (2009). Cuenta en placa de bacterias, 1–10. En http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf

6.3 ANEXOS

Anexo 1. Tablas obtenidas de resultados de bacterias

Bacterias 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	5,477	5,477	5,477
T1	5,954	6,477	5,903
T2	6,699	6,602	7,778
T3	6,778	7,778	7,778

Bacterias 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	7,7782	7,7782	7,7782
T1	7,6990	7,6990	6,3010
T2	5,9542	7,8451	7,8451
T3	8	8	8

Anexo 2. Tablas obtenidas de resultados de hongos

Rhizoctonia sp. 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	3	3	3
T1	2,3010	0	2
T2	2	0	0
T3	0	0	0

Rhizoctonia sp. 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	0	0	0
T1	0	2	2
T2	3,3010	0	0
T3	0	2	0

Penicillium sp. 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	3,301	3,301	3,301
T1	4,602	5,301	5,477
T2	4,000	5,000	2,477
T3	5,000	5,000	3,477

Penicillium sp. 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	3,301	3,301	3,301
T1	5,477	2,477	6,301
T2	6,477	6,000	6,301
T3	3,301	0,000	6,000

Alternaría sp. 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	5	5	5
T1	4	0	0
T2	0	0	0
T3	0	0	5

Alternaría sp. 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	0	3	3
T1	2	0	0
T2	0	0	2
T3	0	0	0

Aspergillus sp. 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	2,000	2,000	2,000
T1	0,000	2,602	4,477
T2	0,000	4,000	5,000
T3	3,301	5,699	0,000

Aspergillus sp. 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	3,477	3,477	3,477
T1	2,301	3,000	2,000
T2	0,000	5,000	2,301
T3	0,000	3,301	0,000

Fusarium sp. 14 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	I	II	III
T0	0	0	0
T1	0	2	5
T2	2	2	3
T3	0	2,301	0

Fusarium sp. 24 días			
Tratamientos	Repeticiones		
	IV	V	VI
T0	2	2	2
T1	2	0	2
T2	2,778	2	2
T3	0	0	0

Anexo 3. Análisis de agua



Plantsphere Laboratories

ANALISIS MICROBIANO DE AGUA PSL119-TRAT MICROBIOLOGICO	
Requerida por: María José Salazar	Fecha de Entrega a Lab: 18.10.2017
Dirección: Universidad Técnica de Ambato (UTA)	Fecha de laboratorio: 04.12.2017
Tipo de Análisis: Microbiano.	Localidad: Ambato-Tungurahua
Orden de trabajo: PSL 119	Telf: 0983573416
	Factura No.: 119

RESULTADOS

E. coli *Klebsiella* *Salmonella* *Bacillus subtilis* *Proteus* *sp.* *Chromartium* *sp.* *Trichoderma harzianum*.

Control	1,9552	1,739982	2,954247	0,3842779	1,2013597	2,0895431	0
T1R1	0,9658	1,195321	1,687315	0,7210543	2,0212417	1,6801234	8,8985899
T1R2	0,5531	1,052014	2,154987	0,5320154	2,5684102	0,9532174	7,9588444
T1R3	0,1349	1,595845	2,987548	0,8605123	1,9562145	1,0652134	7,7901324
T2R1		1,305497	1,154595	2,9515884	1,9532136	0,9563215	8,0712012
T2R2	0,8504	1,907462	0,521554	3,8195471	2,0154683	0,7321461	7,1320121
T2R3	0,5795	2,01545	0,784574	2,8751497	1,6985442	0,8365112	8,3201747
T3R1	0,10578	0,354112	0,142201	3,95054712	1,0284781	0,1214589	9,0265344
T3R2	0	0,491874	0,115450	5,01243014	1,9857842	0	9,9472426
T3R3	0	0,522127	0	4,7321873	2,6137475	0	8,1035286

Nomenclatura:

1. Control es el estado de poblaciones microbianas de agua es su estado natural.
2. T1R1, tratamiento de agua con *Trichoderma harzianum*, producto comercial TRICOMPLEX[®] a una dosis de 50 ml por litro de agua.

3. T1R1, T1R2, T1R3, corresponden a los tratamientos de la dosis de 50 ml por litro de agua.
4. T2R1, tratamiento a una concentración de 75 ml de *Trichoderma harzianum*, producto comercial TRICOMPLEX® a una dosis de 75 ml por litro de agua.
5. T3R1, T3R2, T3R3, son las repeticiones del ensayo respectivo a la dosis de 100 ml por litro de agua.

REQUERIMIENTOS Y SISTEMA DE ANÁLISIS

DE: USPHS Drinking Water Estándar (USA).

World Health Organization (USA). American Water Works Association (USA).



PSL

Dr. Ing. Ms.C. Carlos Falconi Borja Ph.D.

BIONIKA LA

BS PLA

NTSPHERE LA BS


drfalconi-labs@biosoftware.de

plantspherelab@biosoftware.de

098508315-2477715

www.bdki.eu

Anexo 4. Análisis de microbiológico



**CONSULTORES AGRÍCOLAS
ASESORAMIENTO TÉCNICO
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FITOPATOLÓGICO**

DATOS INFORMATIVOS

SOLICITANTE: María José Salazar
MUESTRA: Suelo (Inicial)
FECHA DE INGRESO: 17 de mayo del 2017
FECHA DE ENTREGA: 31 de mayo del 2017
MOTIVO DE ANÁLISIS: Análisis microbiológico

RESULTADOS

Bacterias:
 1.0×10^6 ufc/g de suelo

Hongos:
Rhizopus sp: 1×10^2 upc/g de suelo
Rhizoctonia sp: 1×10^3 upc/g de suelo

Upc: unidad propagadora de colonia
Ufc: unidad formadora de colonia





Figura 1: microorganismos presentes en muestra de suelo inicial.

teléfonos : 0998041540/ 0993200657/ 0991721764 - Mail : agromikroben@gmail.com - Dirección: 10 de Agosto y Dardquea, Riobamba - Ecuador





CONSULTORES AGRÍCOLAS
ASESORAMIENTO TÉCNICO
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FITOPATOLÓGICO

Rhizopus sp. es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, heces animales, y residuos.

Rhizoctonia sp se localiza preferentemente en las capas superiores del suelo (en los dos primeros centímetros). En el suelo, puede en ausencia de plantas o de condiciones favorables, conservarse varios años. Esta conservación se hace bajo forma de esclerocios.

CONCLUSIONES:


No se realizó la identificación por géneros de bacterias por tanto no se puede determinar si son benéficas o patógenas. *Rhizopus* sp y *Rhizoctonia* sp son saprófitos y se encuentran en niveles poblacionales bajos.

Ing. Bosa del Pilar Castro G. PhD

ANALISTA FITOPATÓLOGA



Anexo 5. Análisis específico de *Trichoderma harzianum*



CONSULTORES AGRÍCOLAS
ASESORAMIENTO TÉCNICO
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FITOPATOLÓGICO

MUESTRA T3
Trichoderma sp. 2.5×10^4 upc/g de suelo
Upc: unidad propagadora de colonia


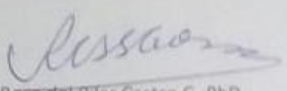



Figura 2: Determinación de población del microorganismo *Trichoderma* sp.

Conclusiones:
El hongo *Trichoderma* sp se encuentra en niveles poblacionales altos.


Ing. Rosalinda Pílar Castro G. PhD
ANALISTA FITOPATÓLOGA

teléfono: 0998041540/ 0993200657/ 0991721764 - Mail: agromikroben@gmail.com - Dirección 10 de Agosto y Darques.
Robamba - Ecuador



Anexo 6. Tablas análisis de varianza

Completely Randomized AOV for Trichoderma

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	65.1142	21.7047	40.72	0.0002
Error	6	3.1983	0.5331		
Total	9	68.3125			

Grand Mean 7.5248 CV9.70

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	0.94	0.4770
O'Brien's Test	M	M
Brown and Forsythe Test	0.39	0.7662

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	134.45	0.0003
Error	3.9		

Component of variance for between groups 8.70069
 Effective cell size 2.4

Trat	N	Mean	SE
1	1	0.0000	0.7301
2	3	8.2159	0.4215
3	3	7.8411	0.4215
4	3	9.0258	0.4215

Completely Randomized AOV for colisq

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	0.60838	0.20279	10.30	0.0088

Error	6	0.11809	0.01968
Total	9	0.72647	

Grand Mean 1.0273 CV 13.66

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.97	0.2205
O'Brien's Test	M	M
Brown and Forsythe Test	1.19	0.3885

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	6.63	0.0781
Error	3.0		

Component of variance for between groups 0.07525
 Effective cell size 2.4

Trat	N	Mean	SE
1	1	1.5669	0.1403
2	3	1.0113	0.0810
3	3	1.1599	0.0810
4	3	0.7308	0.0810

Completely Randomized AOV for salmonsq

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	1.61260	0.53753	26.89	0.0007
Error	6	0.11994	0.01999		
Total	9	1.73254			

Grand Mean 1.2558 CV 11.26

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	1.66	0.2735
O'Brien's Test	M	M
Brown and Forsythe Test	0.93	0.4826

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	28.23	0.0101
Error	3.1		

Component of variance for between groups	0.21269
Effective cell size	2.4

Trat	N	Mean	SE
1	1	1.8586	0.1414
2	3	1.6586	0.0816
3	3	1.1435	0.0816
4	3	0.7643	0.0816

Completely Randomized AOV for proteussq

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	0.08356	0.02785	0.98	0.4608
Error	6	0.16984	0.02831		
Total	9	0.25340			

Grand Mean 1.5424 CV 10.91

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.35	0.1714
O'Brien's Test	M	M
Brown and Forsythe Test	1.06	0.4323

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	10.37	0.0375
Error	3.3		

Component of variance for between groups	-1.871E-04
Effective cell size	2.4

Trat	N	Mean	SE
1	1	1.3044	0.1682
2	3	1.6356	0.0971
3	3	1.5450	0.0971
4	3	1.5258	0.0971

Completely Randomized AOV for Chromatsq

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	3	0.79959	0.26653	31.23	0.0005
Error	6	0.05120	0.00853		
Total	9	0.85079			

Grand Mean 1.1218 CV 8.23

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.27	0.1810
O'Brien's Test	M	M
Brown and Forsythe Test	0.56	0.6602

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	14.72	0.0177
Error	3.7		

Component of variance for between groups	0.10603
Effective cell size	2.4

Trat	N	Mean	SE
1	1	1.6092	0.0924
2	3	1.3110	0.0533
3	3	1.1576	0.0533
4	3	0.7342	0.0533

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

7.1 TÍTULO

Biocontrol mediante el uso de *Trichoderma harzianum*, (Tricomplex) para mejorar la vida microbiana del agua y suelo

7.2 DATOS INFORMATIVOS

Se localizará en el sector El Progreso de la parroquia Cunchibamba del cantón Ambato, provincia de Tungurahua y en sectores aledaños al mismo.

7.3 ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

De acuerdo a los registros de aplicaciones, *Trichoderma harzianum*, es necesario fomentar el conocimiento acerca de nuevas alternativas de saneamiento de aguas antes de implementar los diversos cultivares. *T. harzianum* en la sustitución de fungicidas químicos adquiere gran importancia por la reducción directa de residuos tóxicos en los suelos y aguas destinadas para el regadío. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten, de forma directa y positiva, en el crecimiento y en el desarrollo de las especies vegetales.

7.4 JUTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

En la actualidad los agricultores tienen muchos problemas en sus cultivos agrícolas ya que se ven muy afectados por las enfermedades ocasionadas por diversos hongos y tienen la necesidad de usar productos químicos para el control de diferentes enfermedades y para regular la dureza y pH del agua de regadío, ocasionando

problemas de medio ambiente y de su propia salud, además de la salud de los consumidores.

Por el desconocimiento de nuevas técnicas agrícolas amigables con el ambiente, entre ellas el uso de microorganismos eficientes, cada vez se necesitan mayor cantidad de agroquímicos y nuevas moléculas debido a que las enfermedades en los cultivos han generado resistencia; el agricultor excede la dosis establecida sin conocimiento de modo y mecanismo de acción de los pesticidas generando una gran contaminación. Es por esto que la importancia de sanear el agua con *T. harzianum* genera una alternativa limpia que ayuda a los agricultores a combatir problemas que tiene antes de implementar sus cultivos.

7.5 OBJETIVO

Utilizar 100 ml de *Trichoderma harzianum*., (Tricomplex) en 100 l de agua para el saneamiento del agua y suelo en la florícola Sannaflowers.

7.6 ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Con la aplicación de esta propuesta se podrá disminuir poblaciones de microorganismos patógenos en agua y suelo, conservando y mejorando sus características, afectando de manera positiva a los microorganismos benéficos. Permitiendo a los productores obtener cultivos limpios con orientación a un mejor mercado y con alta rentabilidad.

7.7 METOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

Realizar un análisis microbiológico del agua

- Realizar un análisis microbiológico inicial para saber qué tipos de microorganismos existen en el lugar donde se va inocular el Tricomplex.

Inoculación de *Trichoderma harzianum*

- Utilizar una dosis de 100 ml de Tricomplex (*Trichoderma harzianum*) en un tanque de 100 l de agua de riego, tapar por precaución para evitar el ingreso de agentes externos.

7.8 ADMINISTRACIÓN

Se trabajará con los productores e investigadores del sector. Conjuntamente con la supervisión y asistencia técnica de profesionales de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato