

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA



Efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de El Dorado, Moyobamba – San Martín

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AMBIENTAL

AUTOR

Marco Esaú Avellaneda Vásquez

ASESOR

Denis Izquierdo Hernández

Rioja, Perú

2022

METADATOS COMPLEMENTARIOS

Datos del autor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (opcional)	

Datos del asesor

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	
Número de Orcid (obligatorio)	

Datos del Jurado

Datos del presidente del jurado

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del segundo miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos del tercer miembro

Nombres	
Apellidos	
Tipo de documento de identidad	
Número del documento de identidad	

Datos de la obra

Materia*	
Campo del conocimiento OCDE Consultar el listado:	
Idioma (Normal ISO 639-3)	
Tipo de trabajo de investigación	
País de publicación	
Recurso del cual forma parte (opcional)	
Nombre del grado	
Grado académico o título profesional	
Nombre del programa	
Código del programa Consultar el listado:	

*Ingresar las palabras clave o términos del lenguaje natural (no controladas por un vocabulario o tesoro).

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 021 - 2022/UCSS/FIA/DI

Siendo las 09:30 a. m. del día 23 de junio de 2022 - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. Amada Victoria Larco Aguilar | presidente |
| 2. Luis Darío Santillán García | primer Miembro |
| 3. Segundo Octavio Zegarra Aliaga | segundo Miembro |
| 4. Denis Izquierdo Hernández | asesor |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada **Efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de El Dorado, Moyobamba – San Martín** que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, **Marco Esaú Avellaneda Vásquez** cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación y luego de deliberar, el Jurado acuerda:

APROBAR

DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de **BUENA** y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare **EXPEDITA** para conferirle el **TÍTULO** de **INGENIERO AMBIENTAL**.

Lima, 23 de junio de 2022.

Amada Victoria Larco Aguilar
PRESIDENTE

Luis Darío Santillán García
1° MIEMBRO

Segundo Octavio Zegarra Aliaga
2° MIEMBRO

Denis Izquierdo Hernández
ASESOR

DEDICATORIA

A mis padres don Segundo Víctor
Avellaneda Alva y doña María Justina
Vásquez Bautista.

A mi amada esposa Ellen Lisette y a mi hija
María Emilia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sus abundantes bendiciones, cuidado amoroso de Padre y por los diversos dones recibidos en su Iglesia.

Al Padre Jonathan Hart por la amistad y ayuda brindada en la compra de equipos de laboratorio para pruebas y los análisis de las muestras en este estudio.

A la Universidad Católica Sedes Sapientiae por permitirnos el espacio para la elaboración y ejecución de la investigación.

Al Ing. Denis Izquierdo Hernández por su colaboración desinteresada en la elaboración de esta investigación.

Al Ing. Carlos Egoavil de la Cruz y al estadístico Paco Villalobos Villegas por su ayuda en los análisis de suelo y la interpretación estadística de los datos obtenidos en el experimento.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE APÉNDICES	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas especializadas	12
1.2.1. El suelo como nicho de la biodiversidad microbiológica	12
1.2.2. Función de los microorganismos dentro del suelo.....	13
1.2.3. Etapas de la fijación del nitrógeno molecular por las bacterias	14
1.2.4. Condiciones que influyen en la fijación del nitrógeno por bacterias	14
1.2.5. Bacterias <i>Azotobacter</i> spp.....	15
1.2.6. El glifosato	18
1.2.7. Efecto del glifosato sobre los microorganismos	23
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1. Diseño de la investigación.....	24
2.2. Lugar y fecha.....	24
2.3. Descripción de la investigación	29
2.3.3. Fase de laboratorio	31
2.3.4. Tratamientos.....	38

2.3.5. Unidades experimentales	38
2.3.6. Identificación de variables y su mensuración	39
2.3.7. Diseño estadístico del experimento.....	39
2.4. Materiales	40
2.4.1. Material biológico	40
2.4.2. Herbicida Octano	40
2.4.3. Materiales equipos	41
CAPÍTULO III: RESULTADOS	42
3.1. Determinación de la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro perteneciente a la comunidad nativa El Dorado	42
3.2. Identificación morfológica de cepas de <i>Azotobacter</i> spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor.....	42
3.3. Identificación bioquímica de cepas de <i>Azotobacter</i> spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor.....	44
3.4. Evaluación de los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero.....	45
3.5. Evaluación del comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro en condiciones de invernadero	51
CAPÍTULO IV: DISCUSIONES.....	59
4.1. Determinación de la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro perteneciente a la comunidad nativa El Dorado	59
4.2. Identificación morfológica y bioquímica de cepas de <i>Azotobacter</i> spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor.....	60
4.3. Evaluación de los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero.....	60

4.4. Evaluación del del comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro en condiciones de invernadero	61
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	64
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS	66
TERMINOLOGÍA	74
APÉNDICE	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Pruebas bioquímicas para la caracterización de Azotobacter spp.</i>	16
Tabla 2. <i>Lista de productos con ingrediente activo de glifosato</i>	23
Tabla 3. <i>Puntos de muestreo fincas de la comunidad nativa El Dorado</i>	27
Tabla 4. <i>Puntos de muestreo en la finca El Alba</i>	29
Tabla 5. <i>Tratamientos experimentales para evaluación del efecto del glifosato</i>	38
Tabla 6. <i>Variables de investigación y su mensuración</i>	39
Tabla 7. <i>Determinación de glifosato en suelo cafetalero</i>	42
Tabla 8. <i>Características de las bacterias del género Azotobacter</i>	45
Tabla 9. <i>Datos del análisis físico químico del suelo sin glifosato</i>	46
Tabla 10. <i>Datos del análisis físico químico del suelo con glifosato</i>	46
Tabla 11. <i>Estadísticos descriptivos de pH por dosis de glifosato</i>	47
Tabla 12. <i>Prueba de normalidad para el pH a diferentes dosis de glifosato</i>	49
Tabla 13. <i>Prueba de homogeneidad de varianzas de pH entre diferentes dosis de glifosato</i> ...	50
Tabla 14. <i>Análisis de varianza del pH con cinco diferentes dosis de glifosato</i>	50
Tabla 15. <i>Comparaciones múltiples entre el pH de las cinco dosis de glifosato</i>	51
Tabla 16. <i>Número de colonias por placa Petri después de 4 días de incubación</i>	52
Tabla 17. <i>Número de colonias muertas por placa Petri según dosis de glifosato</i>	53
Tabla 18. <i>Estadísticos descriptivos de muertes de colonias por dosis de glifosato</i>	54
Tabla 19. <i>Prueba de normalidad para muertes de colonias a diferentes dosis de glifosato</i>	55
Tabla 20. <i>Prueba de homogeneidad de muertes de colonias y diferentes dosis de glifosato</i>	56
Tabla 21. <i>Análisis de varianza de las muertes de colonias con cinco dosis de glifosato</i>	57
Tabla 22. <i>Comparaciones múltiples entre muertes de colonias y cinco dosis de glifosato</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Colonias <i>Azotobacter</i> spp. en agar libre de nitrógeno.....	15
<i>Figura 2.</i> Observación microscópica de bacilos y quistes de <i>Azotobacter</i> spp.....	16
<i>Figura 3.</i> Estructura molecular del glifosato.....	18
<i>Figura 4.</i> Vías de descomposición del glifosato en el suelo.	22
<i>Figura 5.</i> Muestreo de suelo en fincas de café de El Dorado.....	26
<i>Figura 6.</i> Muestreo de suelos en fincas de café de Soritor.	28
<i>Figura 7.</i> Finca cafetalera El Alba.	30
<i>Figura 8.</i> Toma de muestras de suelo, finca cafetalera El Alba.....	30
<i>Figura 9.</i> Toma de muestras de suelo, finca el Dorado.....	31
<i>Figura 10.</i> Preparación de agar Ashby Manitol.	32
<i>Figura 11.</i> Técnica de los gránulos de suelo.	33
<i>Figura 12.</i> Incubación de placas Petri.	33
<i>Figura 13.</i> Vista de bacterias al microscopio.	34
<i>Figura 14.</i> Formas de las bacterias observadas en el microscopio.	34
<i>Figura 15.</i> Crecimiento de bacterias en Agar Ashby Manitol.	35
<i>Figura 16.</i> Muestras de suelo en vasos de precipitado.....	35
<i>Figura 17.</i> Colocado de gránulos de suelo con diversas dosis de glifosato.....	37
<i>Figura 18.</i> Recuento de colonias después de agregar suelo con diversas dosis de glifosato. ...	37
<i>Figura 19.</i> Bacterias del género <i>Azotobacter</i>	40
<i>Figura 20.</i> Morfología de bacterias del género <i>Azotobacter</i>	43
<i>Figura 21.</i> Bacilos Gram negativos del género <i>Azotobacter</i>	43
<i>Figura 22.</i> Bacterias del género <i>Azotobacter</i>	44
<i>Figura 23.</i> pH promedio para cada una de las cinco dosis de glifosato.	48
<i>Figura 24.</i> Visualización de la normalidad del conjunto de datos.	48
<i>Figura 25.</i> Boxplot del pH en cada una de las dosis de glifosato.	49
<i>Figura 26.</i> Muertes promedio de colonias para cada una de las cinco dosis de glifosato.....	54
<i>Figura 27.</i> Visualización de la normalidad del conjunto de datos.	55
<i>Figura 28.</i> Boxplot de muertes de colonias en cada una de las dosis de glifosato.....	56

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Autorización para uso del Laboratorio de ciencias básicas.....	76
Apéndice 2. Medio Agar Ashby Manitol	77
Apéndice 3. Reporte de análisis de suelo sobre rastros de glifosato	78
Apéndice 4. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo muestra patrón	79
Apéndice 5. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 1	80
Apéndice 6. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 2.....	81
Apéndice 7. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 3.....	82
Apéndice 8. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 4.....	83
Apéndice 9. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 5.....	84
Apéndice 10. Datos estadísticos realizados con valores del análisis de suelo	85
Apéndice 11. Valores de pH en promedio obtenidos por cada tratamiento	86
Apéndice 12. Recuento de colonias bacterianas antes de la aplicación del glifosato	86
Apéndice 13. Recuento de colonias bacterianas después de la aplicación del glifosato	87
Apéndice 14. Identificación morfológica a través del microscopio	87
Apéndice 15. Constancia de depósito de material biológico.....	88
Apéndice 16. Pruebas estadísticas para pH	90
Apéndice 17. <i>Pruebas estadísticas para muertes de colonias</i>	93
Apéndice 18. Etiqueta del herbicida Octano	96
Apéndice 19. Ficha técnica del herbicida Octano	97
Apéndice 20. Incubadora.....	99
Apéndice 21. Equipo cuenta colonias.....	100
Apéndice 22. Equipo multiparámetro.....	101

RESUMEN

El glifosato, herbicida extendido en diversas partes del mundo, acarrea efectos nocivos para la salud de las personas, el ambiente y la biodiversidad. En la presente investigación realizada en suelos cafetaleros de la comunidad nativa El Dorado, región San Martín, en condiciones de invernadero, se plantearon los siguientes objetivos: i) determinar la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro, ii) identificar morfológica y bioquímicamente cepas de *Azotobacter* spp. a nivel de género, iii) evaluar los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato, iv) evaluar el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro.

Se acondicionó un invernadero dentro del Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Católica Sedes Sapientiae Filial Rioja: Nueva Cajamarca, en un periodo de 120 días desde setiembre 2019 hasta enero de 2020. Se preparó un caldo que tuvo como base la dosis comercial del herbicida Octano (1 kg/200 L de agua), una subdosis y tres sobredosis con cinco tratamientos y cinco repeticiones en vasos de precipitado con 500 g de suelo. Según la técnica de los gránulos de suelo se agregó por tratamiento el suelo contaminado con glifosato en la placa Petri preparada con las bacterias del género *Azotobacter* en Agar Ashby Manitol.

El suelo cafetalero de la comunidad nativa El Dorado presentó cantidades de glifosato no detectables según el método de plaguicidas polares rápidos con un límite de cuantificación de 0,01 mg/kg de suelo, lo cual fue evaluado a 30 días de aplicado el herbicida Octano. Las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* cultivadas en 27 placas, incubadas a 32 °C, utilizando el medio de cultivo Agar Ashby Manitol, presentaron formas de bacilos y cocos con fluorescencia, se identificaron bioquímicamente como Gram negativas y reaccionaron de manera positiva a diversos azúcares. El glifosato, en su formulación comercial de gránulos solubles, según dosis empleadas en el experimento afectó el pH del suelo de manera significativa (KW = 21,409, p-value = 0,0002627), en un proceso temporal de acidificación que va desde

5,23 hasta 3,88. El glifosato, en su formulación comercial de gránulos solubles, según dosis empleadas en el experimento, afectó a las bacterias *Azotobacter* spp. disminuyendo su población de manera significativa (KW = 23,022, p-value = 0,0001254) y en ningún caso este ingrediente activo estimuló su crecimiento.

Palabras clave: *Azotobacter* spp., glifosato, bacterias fijadoras de nitrógeno, suelo cafetalero.

ABSTRACT

Glyphosate, herbicide widespread in various parts of the world, has harmful effects on people's health, the environment and biodiversity. In the present investigation, carried out in coffee soils of the El Dorado native community, San Martín region, under greenhouse conditions, the following objectives were set: i) to determine the presence of glyphosate in the soil of the El Cedro coffee farm, ii) identify morphologically and biochemically strains of *Azotobacter* spp. at the genus level, iii) evaluate the changes in soil pH of the El Cedro coffee farm under five concentrations of glyphosate, iv) evaluate the population behavior of *Azotobacter* spp. under five concentrations of glyphosate applied to the soil of the El Cedro coffee farm.

A greenhouse was conditioned within the Laboratory of Basic Sciences of the Universidad Católica Sedes Sapientiae Filial Rioja: Nueva Cajamarca, in a period of 120 days from September 2019 to January 2020. A broth was prepared based on the commercial dose of the herbicide Octano (1 kg/200L of water), one underdose and three overdose with five treatments and five repetitions in beakers with 500 g of soil. According to the technique of soil granules, the soil contaminated with glyphosate was added by treatment in the Petri dish prepared with the bacteria of the genus *Azotobacter* in Ashby Mannitol Agar.

The coffee soil of the El Dorado native community has non-detectable amounts of glyphosate according to the fast polar pesticide method with a quantification limit of 0,01 mg/Kg of soil, which was evaluated 30 days after the Octane herbicide was applied. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azotobacter* cultivated in 27 plates, incubated at 32 °C, using the culture medium Ashby Mannitol Agar, presented forms of bacilli and cocci with fluorescence, were biochemically identified as Gram negative and reacted positively to various sugars. Glyphosate, in its commercial formulation of soluble granules, according to the doses used in the experiment, significantly affected the soil pH (KW = 21,409, p-value = 0,0002627), in a temporary acidification process that ranged from 5,23 to 3,88. Glyphosate, in its commercial formulation of soluble granules, according to the doses used in the experiment, affected the *Azotobacter* spp.

decreasing its population significantly (KW = 23,022, p-value = 0,0001254) and in no case did this active ingredient stimulate its growth.

Key words: *Azotobacter* spp., Glyphosate, nitrogen fixing bacteria, coffee soil.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, el uso de herbicidas se ha incrementado notablemente durante los últimos años debido a factores como la aparición de malezas resistentes que requieren de mayores dosis, reducción de los precios del producto y en algunos países el incremento de áreas de cultivo (Avigliano, 2018). Según Pedemonte (2017), los herbicidas pueden tener efectos nocivos sobre la salud del ser humano, el medio ambiente y la biodiversidad, especialmente la microbiología del suelo, incluyendo la micro y macrofauna.

Nuestro país es uno de los que más ha invertido en pesticidas para la agricultura de la costa, sierra y selva, debido a la facilidad con que se encuentran estos compuestos en el mercado. Además, existe un control limitado por parte de las autoridades, dejando a merced de los agricultores poder elegir sus productos. Otra de las razones por las que se ha extendido el uso de pesticidas es el bajo costo comparado con la mano de obra para realizar un cultivo. Sin duda, esto traerá consigo efectos nocivos para la salud de los que consumen productos producidos sin ningún control (Mejía, 2005; Ramos, 2016).

Los herbicidas, entre ellos el glifosato, han causado problemas al ecosistema como la degradación de los suelos, la toxicidad en los cultivos, la contaminación de las aguas y del hábitat humano y también han favorecido a la adquisición de resistencia a ellos por parte de los arvenses o malezas (Soares *et al.*, 2019). De modo que el uso indiscriminado del herbicida glifosato afecta la calidad del suelo y de los microorganismos que habitan dentro este ecosistema (Rivera, 2018). El glifosato, después de su aplicación sobre las malezas, puede ser traslocado distribuyéndose a todas las partes de la planta, desde ella al suelo y de allí hacia los seres vivos o plantas no objetivo (Florida *et al.*, 2012).

La importancia de los microorganismos en los ecosistemas naturales y en las parcelas de cultivo de café, se encuentra en la diversidad e interacciones que proveen de nutrientes a las plantas de

cultivo. Las bacterias utilizan mecanismos de colaboración con otros microorganismos y las plantas en la rizosfera de modo que logran una armonía de los seres vivos superiores. Normalmente transforman los compuestos inertes en sustancias asimilables para las plantas y estas les dan soporte (Cano, 2011).

En las comunidades nativas del Alto Mayo, los comuneros alquilan los suelos a agricultores del lugar para el cultivo del café. Esta situación viene generando diversos problemas ambientales, entre los que destacan: deforestación, erosión de suelos, contaminación del recurso hídrico, disminución de la microbiología del suelo por el uso de herbicidas y otros agroquímicos. Existe la incertidumbre causada por el uso de glifosato en suelos de cultivos de café y su posible efecto negativo de manera temporal en las poblaciones de *Azotobacter* spp. fijadoras de nitrógeno, considerando que el glifosato tiene respuestas sensibles a la temperatura y condiciones climáticas (Martínez *et al.*, 2011). Es indispensable que el agricultor conozca los efectos que puede producir este herbicida sobre poblaciones de microorganismos, ya que las bacterias *Azotobacter* spp. influyen de forma directa en la fijación del nitrógeno molecular para que éste pueda ser asimilado por las plantas (Calvo, 2011). La presente investigación evalúa cinco dosis de glifosato en condiciones de invernadero para determinar el efecto de este herbicida sobre la población de bacterias *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de la comunidad nativa El Dorado, provincia de Moyobamba. Además, permite conocer la presencia actual del glifosato en dicho suelo y la dosis respuesta del de dicho herbicida sobre la población de *Azotobacter* spp.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de la comunidad nativa El Dorado en condiciones de invernadero.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro perteneciente a la comunidad nativa El Dorado.
- Identificar morfológica y bioquímicamente cepas de *Azotobacter* spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor.
- Evaluar los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero.
- Evaluar el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro en condiciones de invernadero.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Internacional

Kumar *et al.* (2019) estudiaron la influencia de pesticidas en bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus* y *Salmonella* en Punjab, India. El objetivo fue evaluar los efectos de diferentes pesticidas organofosforados sobre los microorganismos con capacidad de transportar hierro como *Azotobacter vinelandii*. Las cinco cepas bacterianas se adquirieron del Laboratorio Químico Nacional (NCL) Pune-India luego se cultivaron según especificaciones técnicas del (NCL) para ser sometidas a pruebas PGPR y evaluar la producción de ácido indol acético (IAA) mediante la técnica caldo Luria Bertani (LB), la capacidad de solubilización de fosfatos a través del medio de cultivo Pikovskaya y la producción de sideróforos a través de cultivos bacterianos B de King. Durante el experimento se prepararon 4 matraces de 250 ml a los que se les añadió también diversas dosis de organofosforados (0,025; 0,05; 0,1 y 0,2 g/L), después de ser autoclavados se colocaron 10 ml por cada placa y bajo flujo laminar fueron solidificados; en seguida se aplicaron los microorganismos fijadores de nitrógeno como *Pseudomonas fluorescens* (NCIM-5096), *Rhizobium leguminosarum* (NCIM-2749), *Bacillus Brevis* (NCIM-2532), *Azotobacter vinelandii* (NCIM-2821) y *Salmonella typhimurium* (NCIM-2501) y se incubaron a 28 °C durante 72 horas. El análisis estadístico fue realizado con el software Origin 6,0 y 85,0 para el ANOVA. Como resultados determinaron que la producción de ácido indol acético en las 5 cepas bacterianas varía considerablemente con concentraciones de producción: *Pseudomonas fluorescens* (NCIM-5096) 83 µ/ml, *Rhizobium leguminosarum* (NCIM-2749) 74,5 µ/ml, *Bacillus Brevis* (NCIM-2532) 59 µ/ml y *Azotobacter vinelandii* (NCIM-2821) 48,10 µ/ml, en *Salmonella typhimurium* (NCIM-2501), las concentraciones de producción de IAA es bastante baja (20 µg/ml) en comparación con los otros; respecto a la capacidad de solubilización de fosfatos las cinco cepas seleccionadas

podieron formar una zona clara en las placas de agar de Pikovskaya después de 7 días de incubación, cuando se cuantificó espectrofotométricamente, el fosfato máximo fue solubilizado por *Bacillus brevis* (NCIM-2532), el rango de solubilización de P varió de 2 a 16 µg/ml y respecto a la producción de sideróforos el glifosato afectó hasta en un 23 % de producción en las bacterias *Azotobacter vinelandii* lo que significa a mayor dosis de herbicida aplicado disminuyó la capacidad de transportar el hierro por parte de las bacterias respecto al control. Los investigadores concluyeron que los plaguicidas evaluados inhibieron el crecimiento de microorganismos del suelo, disminuyendo la fluorescencia, así como la capacidad de producir sideróforos.

Shahid *et al.* (2019) estudiaron la toxicidad de pesticidas como glifosato, atrazina y otros para las bacterias fijadoras del nitrógeno en los suelos de Uttar Pradesh, India. El objetivo fue evaluar el efecto de los pesticidas sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter*. En el experimento colectaron muestras de suelo de la rizosfera de *Brassica campestris* en campos agrícolas tratados con pesticidas, para luego ser llevadas a laboratorio y realizar los aislados bacterianos. Tomaron 10 g de suelo y prepararon una solución salina normal (NSS); para el aislamiento de *Azotobacter* hicieron en el medio de cultivo manitol de Ashby en placas Petri; sobre el agar sólido colocaron gotas de la solución (NSS) y las incubaron a 28 °C durante 4 y 5 días hasta observar colonias que mostraron coloración marrón mucilaginosa a las que suministraron diversas dosis de pesticidas (0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1; 2,4; 2,7 g/L), la segunda incubación fue durante 48 horas para posteriormente medir el crecimiento bacteriano a través de espectrofotómetro a 600 nm, el daño celular (alteraciones de la membrana y muerte) se hizo a través la técnica naranja de acridina (AO) y yoduro de propidio (PI) mediante microscopía de fluorescencia. Para el análisis estadístico utilizaron la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, prueba de rango (DMRT) y las diferencias mínimas significativas (LSD) a través del software Minitab 17. Como resultados identificaron que *Azotobacter* es una bacteria Gram negativa y mostró reacción positiva a la catalasa, la oxidasa y reducción de nitratos, respecto a los daños celulares las que crecieron en medios con diferentes concentraciones tuvieron rupturas en las membranas, incluso muchas de ellas mostraron un color rojo, es decir las células murieron; además, altas concentraciones de glifosato, disminuyeron significativamente la

población porcentual (41 %) de bacterias debido a la solubilidad, movilidad y absorción del compuesto. En conclusión, los pesticidas causaron impactos tóxicos elevados en estas bacterias alterando su metabolismo, disminuyendo la fijación del nitrógeno y solubilización del fósforo. Bórtoli *et al.* (2012) investigaron los efectos del glifosato sobre las comunidades microbianas presentes en suelo de olivo (*Olea europea* L.) en Córdoba, Argentina. La investigación tuvo como objetivo analizar los efectos del uso de este herbicida sobre el comportamiento de microorganismos. Recolectaron muestras de suelo de plantaciones de olivo de 1 ha a dos metros de radio y a 15 cm de profundidad desde el tronco de árbol seleccionado; posteriormente tomaron 500 g de suelo y lo colocaron en bandejas plásticas de 20 cm de ancho x 25 cm de largo x 7 cm de profundidad. Dentro del experimento fueron incubados los dos tipos de suelo en condiciones controladas para aplicar tres dosis de herbicida 20, 200 y 2 000 mg/kg de suelo y realizaron la evaluación de la actividad microbiana según número de poblaciones de bacterias, hongos y biomasa fúngica en cuatro momentos (1, 10, 30 y 55 días posteriores a la aplicación del compuesto). Las variables estudiadas fueron actividad microbiana, concentración de fluoresceína, respiración y biomasa microbianas, el cálculo de la estimación de poblaciones bacterianas y fúngicas cultivables lo realizaron mediante la técnica de dilución en placa, sembrado en Trypticase Soy Agar (TSA) y agar papa glucosado (APG) incubadas a 25 °C durante dos y cuatro días. La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo la calcularon a través del conteo visual de colonias formadas en cada placa Petri, la actividad microbiana, respiración y biomasa de los hongos y bacterias cultivadas fueron sometidas a un análisis de varianza a una vía poniendo a prueba la normalidad de datos mediante la prueba de Shapiro-Wilks y en todos los análisis estadísticos utilizaron el software INFOSTAT/Profesional 2005. Los resultados obtenidos por los investigadores mostraron que la actividad microbiana registra una ligera caída frente al uso del herbicida en el suelo, generando un aumento de la capacidad de respiración de bacterias, mientras que en la biomasa microbiana no se mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos; sin embargo, la cantidad de hongos y bacterias sufrió una disminución considerable al día 30. Concluyeron que el glifosato aplicado en concentraciones altas altera la actividad y estructura de las poblaciones microbianas del ecosistema edáfico.

Conde (2011) estudió la influencia del herbicida glifosato sobre los microorganismos presentes en suelos de Colonia, Uruguay. Esta investigación tuvo como objetivo conocer los efectos del glifosato, producto de la intensificación agrícola, sobre algunas comunidades microbianas patógenas (*Fusarium solani* sensu lato, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* y *Pythium debaryanum*) y benéficas (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Pseudomonas fluorescens*) del suelo y rastrojo. Utilizó la molécula de glifosato bajo las presentaciones de sal de potasio y sal de isopropilamina, también seleccionó aislados microbianos patógenos y benéficos de sistemas agrícolas del país. En la primera fase realizó ensayos in vitro para evaluar el efecto de dosis crecientes de glifosato sobre el crecimiento radical; luego hizo experimentos con cultivos duales para evaluar el efecto de la molécula sobre las interacciones entre microorganismos benéficos y patógenos, tercero estudió in vitro el efecto de la molécula sobre la producción de peritrecios y finalmente instaló un ensayo macetero en invernadero con suelo extraído de distintas parcelas de uso y frecuencia de aplicaciones de glifosato. El experimento tuvo un diseño en bloques completos al azar con arreglo factorial de los tratamientos (tres moléculas x cinco dosis), con tres repeticiones simultáneas, realizó ensayos utilizando diversas dosis de glifosato (0, 20, 60, 100, 140 mg/L en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA) donde inicialmente sembró cepas de los microorganismos seleccionados. Los datos recolectados de los experimentos in vitro fueron procesados y analizados empleando análisis de varianza utilizando el programa PRC GLM de SAS System versión 9.2, para los aislados *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* y *Pythium debaryanum* analizó la variable Área Debajo de la Curva (ADC) y para *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* y *Pseudomonas fluorescens* la variable analizada fue UFC/ml, las medias de los tratamientos fueron separadas por la diferencia mínima significativa (MDS) y el test de Fisher con $p=0,05$. En los resultados determinó que la densidad poblacional de especies patógenas y benéficas disminuyeron de manera significativa al utilizar dosis crecientes de glifosato, afectando a la especie *Fusarium graminearum* (ADC=26,2) y *Trichoderma harzianum* (ADC=12,9; 240 UFC inicial y 165 UFC después de utilizar las moléculas), siendo esta última la más afectada. Concluyó que el glifosato, en función de la dosis utilizada, redujo el crecimiento de las comunidades microbianas benéficas, afectó la interacción entre *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. y tuvo un efecto inhibitorio mayor entre los aislados antagonistas con relación a los patógenos.

Martínez *et al.* (2011) estudiaron los efectos del glifosato sobre microorganismos fijadores del nitrógeno presentes en el ecosistema Alto Andino y Seco Tropical de Cundinamarca y Tolima, Colombia. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto del glifosato sobre microorganismos diazotróficos y nitrificantes. Para el muestreo de suelos eligieron cuatro zonas, dos pertenecientes a ecosistema Alto Andino (bosque y arroz) y dos a Seco tropical (bosque y papa) de los que obtuvieron 15 muestras, para ser homogenizadas y obtener 226 g de suelo por cada muestra, luego fueron colocadas en contenedores. Las unidades experimentales utilizadas siguieron un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial con tres repeticiones por tratamiento, en total obtuvieron 36 unidades experimentales (9 unidades por cada zona, es decir 18 por cada ecosistema), luego suministraron dos dosis de glifosato (3,1 L/ha y 10,4 L/ha) por 100 ml de solución por cada contenedor. Evaluaron la densidad poblacional de bacterias nitrificantes y fijadoras de nitrógeno mediante la técnica del número más probable (NMP) en tres momentos: antes de la aspersión ($t=0$ h), después de 48 h y a las 192 h de haberse aplicado el glifosato. Los investigadores emplearon un análisis de varianza de cuatro factores, y verificaron las diferencias a través de la Prueba Múltiple de Duncan. Los resultados demostraron que los microorganismos oxidantes del amonio y del nitrito presentaron diferencias significativas en la respuesta de aspersión del herbicida ($P=0,0214$ y $P=0,0214$ respectivamente) a las 48 h y a medida que fueron aumentando las dosis de glifosato en los cuatro tipos de ecosistema. Concluyeron que los efectos del glifosato sobre las poblaciones microbianas fijadoras del nitrógeno son temporales, dependen del tipo de ecosistema y la zona muestreada y de las dosis aplicadas del herbicida.

Piola (2011) evaluó el impacto de plaguicidas como glifosato y clorpirifos en suelos agrícolas de Buenos Aires, Argentina. El objetivo fue estudiar el uso de plaguicidas a través de bioensayos integrados laboratorio-campo. La investigación tuvo un enfoque cuantitativo y diseño experimental que consistió en implementar una batería de biomarcadores con *Eisenia andrei* para los ensayos de laboratorio en condiciones controladas de temperatura y humedad. Para el bioensayo exposición a papel las lombrices fueron depositadas en frascos de vidrio, cubiertos

por papel filtro, posterior a ello aplicó distintas concentraciones de glifosato 7,5; 15 y 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para el formulado A y 60, 120 y 240 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para el formulado C quedado en contacto por 28, 48 o 72 horas y para el bioensayo exposición a suelo artificial los organismos fueron expuestos a concentraciones subletales de 200 mg/kg (A) y 500 mg/kg (C) usando 6 lombrices por cada réplica (3 repeticiones por cada tratamiento) en recipientes de (20 x 10 x 10 cm) por un tiempo de 14 días. Para los ensayos en campo las tierras con cultivo de trigo fueron fumigadas con glifosato y clorpirifos a dosis recomendadas para el control de plagas (960 g/ha), los tratamientos fueron realizados siguiendo un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con 3 parcelas de 13 x 5 m cada uno y tres repeticiones. En todos los análisis estadísticos empleó el programa GraphPad InStat 3, aplicó el ANOVA o test no paramétrico de Kruskal-Wallis, comparó las medias a través de la prueba de Tukey y las correlaciones mediante la prueba de Pearson. Los resultados mostraron que en el bioensayo papel filtro para el glifosato durante 72 horas existe una variación significativa en el peso de las lombrices, además evidenció un efecto subletal en todos los ensayos; respecto al bioensayo suelo artificial a los 14 días de exposición la pérdida de masa de las lombrices fue mayor al 30 %, pero no hubo mortalidad, de manera particular pudo notar el efecto negativo por la evasión de las lombrices a suelos contaminados con los plaguicidas, finalmente para el ensayo en campo durante el primer monitoreo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y la muestra control, posterior a los 118 días las lombrices mostraron variabilidad en la densidad de su población. El investigador concluyó que estos plaguicidas, utilizados para el control de malezas, producen estrés tóxico; además de afectar la población objetivo, afectan a otros seres vivos de los agroecosistemas, produciendo evasión, muerte y lesiones cutáneas por lo que existe un riesgo asociado al uso extensivo de plaguicidas influenciados por las condiciones ambientales de cada lugar.

Lara *et al.* (2007), en el estudio sobre bacterias fijadoras de nitrógeno en la zona agrícola de Córdoba, Colombia, realizaron aislamientos de bacterias diazotróficas de los géneros *Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp. a partir de la rizosfera de cultivos de plátano, pasto, maíz y rastrojos. El objetivo fue determinar la producción del ion amonio a partir de los aislados. El experimento consistió en obtener las muestras de suelo considerando una profundidad de 15 cm a partir de la superficie haciendo un recorrido en zig-zag, luego aplicaron el método de cuarteo

hasta obtener una muestra de 1000 g de suelo de cada cultivo. Para el aislamiento de las bacterias tomaron diluciones de cada muestra de suelo y fueron sembradas en placas Petri con medios como el Asbhy a una temperatura de 28 °C durante 3 días. Los datos estadísticos fueron analizados con el software Analyse-it Microsoft Excel, los valores entre medias fueron comparados mediante t de Student. Los resultados demostraron la capacidad fijadora de nitrógeno de las bacterias *Azotobacter*, obteniendo valores de hasta A16PG=5.15ml/L y A26M1P=5.17 ml/L. Concluyeron que estas bacterias fueron las más eficientes en la fijación biológica del nitrógeno (FNB), en la producción del ion amonio (NH^{4+}) de forma libre, lo cual trae consigo grandes beneficios con mejoras en la producción agrícola, contribuyendo de esta manera para que los agricultores no usen agroquímicos ya que estos producen salinización de los suelos, problemas de drenaje, compactación del suelo y disminución de la actividad microbiana comprometida en el proceso de nutrición vegetal.

Nacional

Rivera (2018) realizó una tesis sobre los efectos del herbicida glifosato para la microfauna del suelo cafetalero en San Ignacio, Perú. El objetivo fue evaluar la influencia de la aplicación de diferentes dosis de glifosato en la microfauna del suelo del cultivo de café (*Coffea arabica*) variedad Catimor. El enfoque de la investigación fue cuantitativo con un diseño experimental, las variables de estudio fueron: aplicación de glifosato y microfauna del suelo. La población estuvo constituida por 1400 plantas de café de 3 años; ubicó la muestra en el centro de la parcela consiguiendo un total de 96 plantas separadas en parcelas de 12 plantas cada una, de las cuales obtuvo inicialmente de manera aleatoria 2 muestras de 500 gramos de suelo para el análisis de parámetros fisicoquímicos, después de la aplicación del herbicida tomó 3 y posteriormente 4 muestras para el estudio biológico del suelo. En el experimento, el autor utilizó un diseño en bloques completamente al azar (DBCA), aplicó tres dosis de diferentes concentraciones del herbicida (1; 1,5 y 2 L/ha), la parcela control no recibió ningún tratamiento. En el estudio consideró a los microorganismos presentes en el suelo, dentro de los cuales hubo bacterias y hongos. El análisis estadístico fue realizado a través del programa Microsoft Excel. Los resultados mostrados fueron valores no significativos en cantidades de *Pseudomonas* (T1: 180 000, T2: 3 400 y T3: 63 000 NMP/g), actinomicetos (T1:390 000, T2: 390 000 y T3: 180 000

UFC /g) y bacterias fijadoras de nitrógeno libre (T1: 180 000, T2: 150 000 y T3: 180 000 NMP/g), los cuales fueron asociados a la temporada del lugar. En conclusión, el investigador determinó que el herbicida glifosato no influye directamente en los microorganismos del suelo cafetalero debido a que las condiciones climáticas del lugar favorecen la lixiviación de las moléculas del herbicida.

Ramos (2016) desarrolló una tesis sobre el efecto del glifosato para los organismos y las propiedades del suelo en una plantación forestal de *Cedrela lilloi* C.DC. en Huánuco, Perú. El objetivo de la investigación fue explicar el efecto del glifosato sobre las propiedades del suelo con plantaciones forestales. La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, alcance comparativo-explicativo y diseño experimental. La población estuvo constituida por la totalidad de monolitos de un área de 1600 m² y la muestra por 32 monolitos de suelo de 25 cm x 25 cm x 30 cm de profundidad, 8 monolitos por cada tratamiento; en el experimento, utilizó un diseño completamente al azar en campo con 32 unidades experimentales, a las que aplicó dos dosis de glifosato 1,0 y 1,5 kg/ha para evaluar las siguientes variables: propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Para el análisis estadístico empleó el ANOVA aplicando la prueba de Duncan a los grupos con diferencia significativa a través del software SPSS v.20; además incluyó la prueba de correlación de Pearson para determinar el grado de relación entre las variables de estudio. Como resultado, determinó que el glifosato alteró las propiedades físicas del suelo con un incremento del nivel de humus a 1,15 cm y obtuvo un valor de fósforo alto en suelos con glifosato (8,88 ppm); obtuvo un descenso significativo de lombrices, hormigas y termitas (-20, -378, -178 ind/m² respectivamente). En conclusión, determinó que las propiedades biológicas del suelo son más sensibles a los efectos del herbicida glifosato ocasionando la muerte de los organismos vivos.

Florida *et al.* (2012) desarrollaron una investigación acerca de los efectos de dos herbicidas (paraquat y glifosato) en propiedades del suelo, la presencia de bacterias y hongos en Tingo María, Perú. El objetivo fue evaluar los efectos del paraquat y glifosato en bacterias y hongos, determinando el número de bacterias y hongos por gramo de suelo. El área donde instalaron las

parcelas fue de 6 m² por cada tratamiento con características homogéneas; además, tuvieron en cuenta el tipo de plantación forestal *Calycophyllum spruceanu* de 12 años de edad, incluyendo plantas herbáceas como: *Arachis pintoii*, *Buddleja globosa* y *Pueraria phaseoloides*. El experimento tuvo un ajuste estadístico del diseño de bloques completamente randomizado (DBCR). Luego de instalar las parcelas procedieron a limpiar y delimitar de manera independiente tres bloques con sus respectivos tratamientos de los herbicidas paraquat y glifosato, haciendo un total de 30 unidades experimentales. Seguidamente realizaron el análisis inicial físico y químico del suelo y la enumeración de bacterias y organismos fungi; conocido los datos anteriores procedieron a suministrar diferentes concentraciones de herbicidas (0, 1, 2, 3 y 4 ml/L) con tres repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico fue realizado en el programa SPSS 19, a través de análisis de varianza Duncan y análisis de regresión lineal. Los resultados obtenidos con cuatro evaluaciones a intervalos de tres meses fueron significativos pues el número de bacterias por gramo de suelo disminuyó (de 276,0-1330,9 a 34,2-681,0*10³) en los tratamientos con ambos herbicidas. Los investigadores concluyeron que el glifosato afectó el número de bacterias y hongos por gramo de suelo; además, incrementó la temperatura, el pH y la materia orgánica, propiedades del suelo que condicionan el desarrollo de estos microorganismos.

1.2. Bases teóricas especializadas

1.2.1. El suelo como nicho de la biodiversidad microbiológica

El suelo es un ecosistema en el que se albergan gran cantidad de flora y fauna que sirven para dinamizar, degradar y acelerar los procesos de captación de nutrientes. Según Jordán (2006, p. 47) menciona que “el número puede oscilar entre 60 y 3 000 millones de bacterias por gramo de suelo”.

El suelo como un sistema cumple tres características fundamentales: (a) complejidad, entendida como la atmósfera interna e interrelación entre el agua, la flora y la fauna, partículas orgánicas y minerales; (b) dinamismo, a través del cual el suelo adquiere propiedades por la acción

combinada entre las condiciones climáticas y la vegetación, en gran medida la diversidad de microorganismos del suelo van formando la capa del suelo rica en nutrientes que pueden ser asimilados por las plantas y éstas ofrecen sustancias para el metabolismo de dicha micro fauna; (c) permeabilidad, ya que el suelo es considerado un sistema abierto y esta característica hace posible la mayor o menor facilidad de degradación (Jordán, 2006). Con estas características, el suelo se convierte en ecosistema viviente y dinámico, que alberga a diversos seres vivos y gracias a la biodiversidad se pueden obtener beneficios como diversos cultivos, servicios y fijación de elementos (García, 2011).

1.2.2. Función de los microorganismos dentro del suelo

Los microorganismos son los seres vivos capaces de degradar azúcares, celulosa y proteínas de los residuos orgánicos. De este modo ayudan a la formación de la materia orgánica y el enriquecimiento de los suelos proveyendo de sustancias asimilables para las plantas (Jordán, 2006). Estos seres vivos en el suelo desarrollan una amplia gama de acciones que inciden en el crecimiento y nutrición vegetal (López *et al.*, 2015). Las bacterias utilizan mecanismos de colaboración con otros microorganismos y las plantas en la rizosfera de modo que logran una armonía de los seres vivos superiores. Normalmente, transforman los compuestos inertes en sustancias asimilables para las plantas y estas les dan soporte (Cano, 2011).

Jaramillo (2002) afirma que, dentro de los microorganismos del suelo, los más numerosos y pequeños son las bacterias, éstas en su mayoría son heterótrofas y actúan como los descomponedores más importantes de la materia orgánica, el reciclaje de energía y nutrientes como el carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P). Dentro de las bacterias que predominan en el suelo encontramos a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* (García, 2011).

1.2.3. Etapas de la fijación del nitrógeno molecular por las bacterias

La fijación del nitrógeno o diazotrofismo es realizada por algunas bacterias que tienen la capacidad de producir una enzima llamada nitrogenasa, la cual reduce el nitrógeno molecular o atmosférico (N_2) en amoníaco (NH_3), esta disociación que requiere de gran cantidad de energía (Madigan *et al.*, 2003) se va haciendo como simbiosis en asociación con las plantas o en forma libre (Jaramillo, 2002), logrando su asimilación por las plantas (Calvo, 2011).

En diversos medios existe una gran biodiversidad microbiológica de bacterias que hace posible la fijación del nitrógeno molecular, síntesis de proteínas, solubilización de elementos como el fósforo y fierro, así como la producción de antibióticos (López *et al.*, 2015). Esta diversidad biológica de bacterias fijadoras del nitrógeno ya sea por su taxonomía y fisiología, pertenece principalmente al género arquea y bacteria (Ramos *et al.*, 2018).

1.2.4. Condiciones que influyen en la fijación del nitrógeno por bacterias

Las condiciones que influyen para la fijación del nitrógeno por medio de las bacterias son las siguientes: (a) presencia de oxígeno como ayuda imprescindible para la supervivencia de los microorganismos aeróbicos; (b) las condiciones de acidez o alcalinidad varían de acuerdo con los diversos organismos, por ejemplo, las bacterias *Azotobacter* spp. tienen preferencia por suelos con $pH > 5$; (c) altas concentraciones de nitrógeno que limitan las actividades de estos microorganismos pues inhiben el adecuado funcionamiento de la nitrogenasa; (d) los elementos como el Ca, Mg, Fe, S, B, Co, Mo y V son indispensables para el proceso de fijación del nitrógeno molecular; (e) elementos como el Al y Mn influyen de manera negativa en la fijación del nitrógeno molecular; (f) la temperatura se encuentra dentro del rango de 28 a 40 °C para las bacterias fijadoras del nitrógeno; (g) la humedad afecta a las bacterias por su relación que tiene con el oxígeno; (h) factores de manejo de suelo y de cultivos trastocan el desarrollo de los microorganismos dentro del suelo; (i) y los factores bióticos como la especificidad en cuanto a las bacterias simbióticas, la competitividad propia de los microorganismos y la supervivencia (Orozco, 1999, citado por Jaramillo, 2002).

1.2.5. Bacterias *Azotobacter* spp.

Las bacterias del género *Azotobacter* spp. son microorganismos capaces de fijar el nitrógeno en vida libre haciendo que este elemento se vuelva asimilable para las plantas, además ayudan a solubilizar el fósforo (P) y proveen de sustancias que promueven el crecimiento de las plantas (Jiménez, 2007). Este género de bacterias son Gram negativas que viven en presencia de oxígeno, tienen formas diversas como bacilos y cocos; algunas especies podrían contar con flagelos, su tamaño se encuentra en un rango de 2 a 10 μm de longitud y 1 a 2 μm de ancho (Jnawail *et al.*, 2015). Las colonias observadas en la placa (Figura 1 y 2), incubadas a una temperatura de 30 °C a partir de las 48 horas, presentan colores amarillentos y son mucilaginosas transparentes (Román *et al.*, 2014; Esqueche y Quispe, 2017).



Figura 1. Colonias *Azotobacter* spp. en agar libre de nitrógeno. Fuente: Esqueche y Quispe (2017).

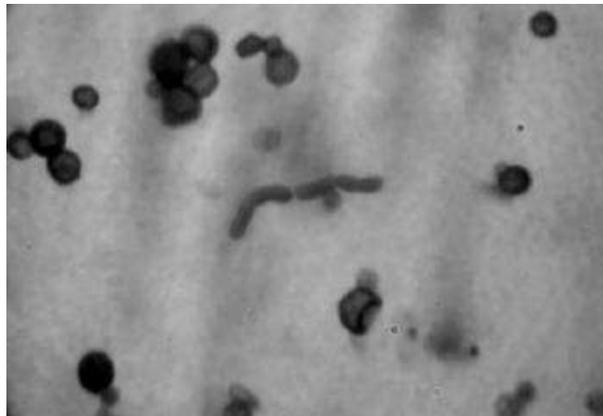


Figura 2. Observación microscópica de bacilos y quistes de *Azotobacter* spp. Fuente: Escobar et al., (2011).

El género de bacterias *Azotobacter* puede ser identificado bioquímicamente mediante pruebas (Tabla 1) como catalasa, oxidasa, utilización de azúcares, producción de pigmentos, formación de quistes y motilidad (León y Rojas, 2015).

Tabla 1

Pruebas bioquímicas para la caracterización de Azotobacter spp.

Prueba	Especies					
	<i>A. vinelandii</i>	<i>A. beijerinckii</i>	<i>A. paspali</i>	<i>A. armeniacus</i>	<i>A. nigricans</i>	<i>A. chroococcum</i>
Movilidad	+	-	+	+	-	-
Filamentos en cultivos jóvenes	-b	-b	+	-b	-b	-b
Oxidasa	+	D	-	D	D	D
Peroxidasa	+	+	+	D	+	+
Nitrato-nitrito	+	+	+	-	+	+
Meso-inositol	+	D	-	D	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Sucrosa	+	+	+	+	+	+
Malonato	+	+	-	-	D	D
Benzoato	D	+	-	-	-	+
Caproato	+	-	-	-	-	+
Caprilato	+	-	-	+	-	-
Maltosa	+	D	-	+	D	+
Rafinosa	D	D	-	D	D	+
Glicerol	+	D	-	-	-	D
Sorbitol	+	D	-	+	D	+
Manitol	+	D	-	+	D	+
Ramnosa	+	-	-	-	-	-

Nota: -b: producción de filamentos, D: 11 a 89 % cepas positivas, +: 90 % o más cepas positivas, -: 90 % o más cepas negativas.

Fuente: León y Rojas (2015).

Función de las bacterias *Azotobacter* spp.

Las bacterias *Azotobacter* spp. son capaces de producir antibióticos y estimulantes para el crecimiento de las plantas como auxinas, giberelinas y citoquininas; de modo particular fijan el nitrógeno atmosférico, producen vitaminas, pigmentos y aminoácidos (Jiménez, 2007).

Según Holt (2000), citado por Jiménez (2007, p. 28) estas bacterias, en el proceso de degradación de la materia orgánica asimilando los azúcares, pueden “fijar al menos 10 mg de N₂ por gramo de carbohidrato consumido”. Siendo este el género de bacterias más empleado para la biofertilización de cultivos (Huete *et al.*, 2019).

Proceso de fijación del nitrógeno por bacterias *Azotobacter* spp.

Las bacterias *Azotobacter* spp., son microorganismos reductores de N₂, presentan actividad del complejo enzimático N-asa, en un ambiente aireado. Se ayudan de los cofactores hierro y molibdeno (FeMoCo) haciendo posible la reducción del nitrógeno. Esto permitirá la utilización de estas bacterias como biofertilizantes reemplazando los fertilizantes químicos (Eimerich, 2012, citado por Ramírez y Ugaz, 2014).

Medios de cultivo para bacterias *Azotobacter* spp.

Las bacterias *Azotobacter* spp. en su proceso de asimilación de nutrientes, utilizan diversos ácidos orgánicos, azúcares o derivados alcohólicos, los cuales son su fuente de carbono y energía; de modo general, se emplean agares como el manitol (Jiménez, 2007).

Dentro de los medios de cultivo selectivos para este género de bacterias tenemos el Agar Ashby (Valderrama, 2013). En este medio libre de nitrógeno, después de 48 h de incubación a 30 °C,

podemos observar el desarrollo de colonias transparentes y mucilaginosas de color amarillo consideradas del género *Azotobacter* spp. (Román *et al.*, 2014).

1.2.6. El glifosato

Definición y estructura química

Avigliano (2018, p. 7) define el glifosato (N-fosfometil-glicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6) como “un herbicida sistémico no selectivo que puede inhibir eficientemente el crecimiento de plantas, tanto terrestres como acuáticas, interfiriendo con la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano)”.

Se muestra como sal de isopropilamina, sal de potasio y sal de amonio; además contiene agentes surfactantes, antiespumantes, biocidas e inorgánicos (Campuzano *et al.*, 2017). Se trata de un sólido cristalino con un peso molecular de 228,18 g/mol, solubilidad de 12 g/L a 25 °C y densidad aparente de 0,5 g/cm³, en cuanto a la concentración se extiende desde los 350 a 720 g de ingrediente activo por kilogramo (Salazar y Aldana, 2011). Tiene la siguiente estructura molecular (Figura 3).

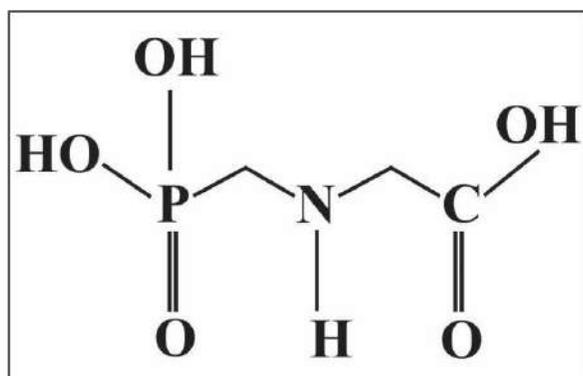


Figura 3. Estructura molecular del glifosato. Fuente: Zhan *et al.*, (2018).

Difusión del herbicida glifosato

Existe una excesiva aplicación de herbicidas en la agricultura, sobre todo como controladores de malezas en cultivos de lento crecimiento, debido a que son económicamente rentables comparado con la mano de obra empleada para la limpieza de las plantaciones (Perea y Tupac, 2016). El glifosato, cuyo metabolito mayoritario es el ácido aminometilfosfónico (AMPA), viene siendo usado desde la década de los 70 introducido por Monsanto con el nombre comercial de Roundup como controlador de las malezas. Se trata de uno de los herbicidas más utilizados en el mundo y dentro de la agricultura (Camino y Aparicio, 2010), siendo el herbicida más utilizado en el sector agrícola, sólo en el año 2013 la producción de este herbicida a nivel mundial se estimó en 630 000 t, superando a otros herbicidas (Ramírez *et al.*, 2017), para el año 2014 aumentó a 825 000 t (Huhn, 2018); actualmente este herbicida es fabricado por más de 90 productores en 20 países (Centner *et al.*, 2019).

Modo de acción

El glifosato es un herbicida que, una vez realizada la fumigación, entra en la planta y su efecto se extiende a todos los meristemas distantes, logrando eliminar la maleza de forma lenta (Duke, 2017). De manera sistémica entra en la planta, interfiere en la síntesis de proteínas, destruye las células y promueve un crecimiento descontrolado de las hojas (Sousa *et al.*, 2019); particularmente interviene en la degradación de la clorofila, logrando como resultado un color amarillento y la necrosis del follaje (Van Bruggen *et al.*, 2018).

Villalba (2009) mostró el recorrido de la molécula glifosato una vez que entra en contacto con las hojas de las plantas: (a) entra en las células de la planta, (b) inhibe la 5-enopiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), (c) codificada por el núcleo va al cloroplasto, (d) enlaza una molécula de shikimato-3-fosfato (S3P) junto a una de PEP, (e) toma el sitio de la enzima, (f) por su parecido al PEP compite con éste y queda formado al complejo shikimato, (g) comienza a actuar en la planta paralizando su crecimiento, (h) causa la muerte de la planta.

Persistencia del glifosato en el suelo

El glifosato tiene la facilidad de movilizarse dentro del suelo por su semejanza con muchos compuestos que se encuentran en la naturaleza. Esto responde a la estructura química del mismo, por lo cual no es netamente reactivo. El destino final dentro del ambiente según Paz y López (2011) es la formación de complejos con iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} presentes en el agua; a través del proceso de adsorción se encuentra en forma de sedimentos o partículas suspendidas en el agua y el suelo; y además por acción de las plantas entran dentro de su metabolismo siendo asimiladas junto a los nutrientes y algunos microorganismos logran degradarlo.

Este compuesto, una vez que entra en contacto con la planta, se introduce dentro de ella de forma sistemática y de allí se puede movilizar en el suelo por competencia con el fósforo, el cual podría ser asimilado por las plantas consideradas no objetivo (Salazar y Aldana, 2011; Soares *et al.*, 2019). La adsorción del glifosato en el suelo se atribuye a la reactividad del grupo funcional fosfonometilo (Padilla *et al.*, 2019), y su permanencia se ve influenciada por características del suelo como el potencial de fijación de fósforo, el hierro disponible para la planta, pH, cantidad de arena, materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico (Salazar y Aldana, 2011). A las características ya mencionadas se añaden la presencia de fosfatos y carbono orgánico; los fosfatos empleados en el proceso de fertilización creando competencia con el glifosato (Huhn, 2018) en el proceso de absorción de elementos para las plantas (Sidoli *et al.*, 2015).

La persistencia del glifosato en el suelo es amplia, algunos estudios muestran que en 60 días esta molécula solo logra una mineralización de 12 % para el horizonte A del suelo (Tévez y Dos Santos, 2015). Se puede señalar que esta molécula se mantiene activa en el suelo por varios días e incluso meses, llegando a permanecer 315 días según condiciones climáticas y características del suelo (Montero *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2019) por su adherencia a la materia orgánica y la arcilla lo cual le permite acumularse en el tiempo (Sidoli *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2019).

El glifosato es adsorbido por suelos que tienen mayor cantidad de materia orgánica, mientras que, en aquellos suelos minerales, es menor debido a la lixiviación producto de lluvias en determinados lugares (Pérez *et al.*, 2013). Existe riesgo potencial que este compuesto afecte los ciclos biológicos del suelo, acumulación y aumentación en el ambiente (Ansari *et al.*, 2019). Y, considerando el suelo como un ecosistema, los herbicidas van a influir de manera activa sobre su calidad y fertilidad, contaminando las plantas de cultivo (Santric *et al.*, 2018).

Descomposición del glifosato en el suelo

El glifosato, en su proceso de degradación, tiene dos rutas metabólicas o vías de descomposición (Figura 4). La primera ruta es la degradación del glifosato en ácido aminometilfosfónico (AMPA) que luego es metabolizado a CO₂ y la segunda ruta es de la sarcosina que da lugar a la unión C-P resultando en fosfato inorgánico y glicina (Vera, 2011). La molécula glifosato puede degradarse al final como carbono, nitrógeno y fósforo, según esta descomposición las bacterias y hongos pueden asimilarlo como alimento (Ansari *et al.*, 2019).

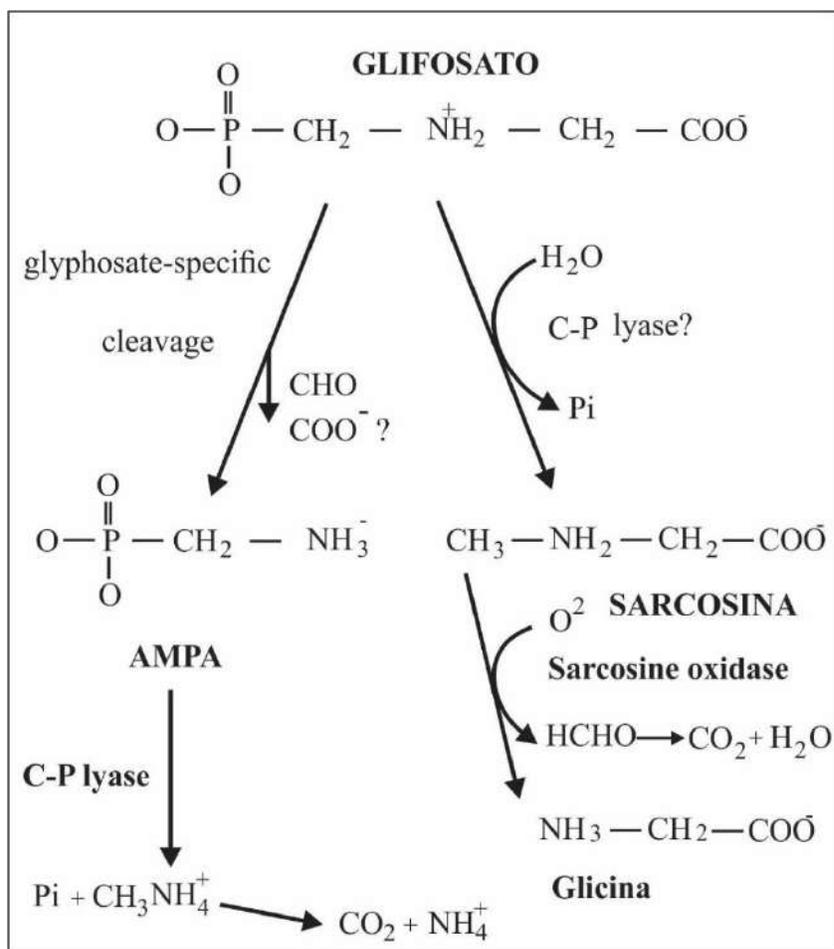


Figura 4. Vías de descomposición del glifosato en el suelo. Fuente: Zhan et al., (2018).

Productos comerciales en base a glifosato

El glifosato en el Perú tiene las siguientes denominaciones según las distintas empresas: Productos Campo-Agro Perú S. A. C. como Campo Sato 757 SG e Interoc como Erraser, CapeAgro S. A. C. como Herbaglif, Agrinor S. A. C. como 18 Glifo Cem, Farmagro S. A. como Destructor, Química Suiza Industrial del Perú S. A. como Quimifosato y Farmex S. A. lo denominará Roundup 747 SG (Ramos, 2016), Montana como Octano. Se muestra en la siguiente tabla algunos de ellos más usados en San Martín (Tabla 2).

Tabla 2

Lista de productos con ingrediente activo de glifosato

Número de registro	Nombre comercial	Nombre común	Titular del registro	Dosis (kg/200 L)
1733 - SENASA	OCTANO	GLIFOSATO	MONTANA S.A.	1
389-97-AG-SENASA	GLYPHOGAN 48 SL	GLIFOSATO	PROFIANDINA PERU S.A.	2
420-97-AG-SENASA	GLYFO 4	GLIFOSATO	SERFI S.A.	2
421-97-AG-SENASA	RUSTER UP	GLIFOSATO	SERFI S.A.	1
423-97-AG-SENASA	QUIMIFOSATO	GLIFOSATO	INDUSTRIAL DEL PERU S.A	2
592-98-AG-SENASA	HERBOSATO	GLIFOSATO	DROKASA PERU S.A	4
635-98-AG-SENASA	GLITEC	GLIFOSATO	KLINGE S.A.	2
747-98-AG-SENASA	FUEGO	GLIFOSATO	NEO AGRUM S.A.C.	2
840-99-AG-SENASA	BATALLA 480 SL	GLIFOSATO	BAYER S.A.	2

Fuente: SENASA (2015)

1.2.7. Efecto del glifosato sobre los microorganismos

Los herbicidas en general afectan a los microorganismos presentes en el suelo (Bailón *et al.*, 2015). El herbicida glifosato genera daños al ambiente y a la población expuesta (Campuzano *et al.*, 2017). El suelo es el primer ecosistema afectado por el uso de agroquímicos, cuyos efectos se extienden a la flora y fauna, alterando sus condiciones naturales e interfiriendo en el equilibrio existente antes de la fumigación, con el paso del tiempo y las repeticiones de diversas dosis en campos de cultivo, existe el riesgo de afectar plantas que nos proveen de alimento (Pérez *et al.*, 2013).

Algunos estudios demuestran que el glifosato interviene en la composición microbiana y la actividad enzimática en rizosferas vegetales (Hagner *et al.*, 2019), disminuye la población de bacterias encargadas de la colonización micorrízica en el suelo (Caldas, 2019). Este efecto se mostrará según las concentraciones de glifosato, las condiciones fisicoquímicas del suelo y las condiciones climáticas de la región (Santric *et al.*, 2018).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de la investigación

La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, fue experimental y se utilizó un diseño completamente al azar (DCA); cumplió con un plan en el que se abordó una serie de etapas muy rigurosas con la finalidad de recolectar datos para describir procesos de aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* así como su identificación morfológica y bioquímica y la evaluación de los efectos del glifosato sobre la población de estas bacterias con el fin de probar la hipótesis; además, se determinaron variables contextualizadas con base en la medición numérica, el análisis estadístico, prueba de teorías y la elaboración final de conclusiones (Hernández *et al.*, 2014). Se abordó el tema con un alcance exploratorio a través del descubrimiento de conceptos o fenómenos y se estableció las relaciones entre ellos; durante el proceso de experimentación se ha verificado las causas de los sucesos estudiados por lo que también tuvo un alcance explicativo (Hernández *et al.*, 2014).

2.2. Lugar y fecha

Para el aislamiento e identificación de bacterias *Azotobacter* spp., se colectaron muestras del suelo cafetalero de la finca El Alba (se incluyó los pelos radiculares del café) (Escobar, *et al.*, 2011), ubicada en el caserío Nuevo Horizonte, distrito de Soritor (Figura 5) durante la primera semana del mes de setiembre del año 2019, siguiendo un muestreo sistemático (Tabla 3), se eligieron tres puntos.

Para identificar la presencia de glifosato se colectaron muestras de suelo en la finca El Cedro, ubicada en la comunidad nativa El Dorado, distrito de Moyobamba, región San Martín (Figura 6), durante la tercera semana del mes de setiembre del mismo año, empleando un muestreo sistemático en forma de zigzag (Schweizer, 2011) eligiendo cinco puntos (Tabla 4), las mismas que fueron utilizadas durante el proceso experimental.

La investigación se realizó desde el mes de setiembre de 2019 hasta febrero de 2020.

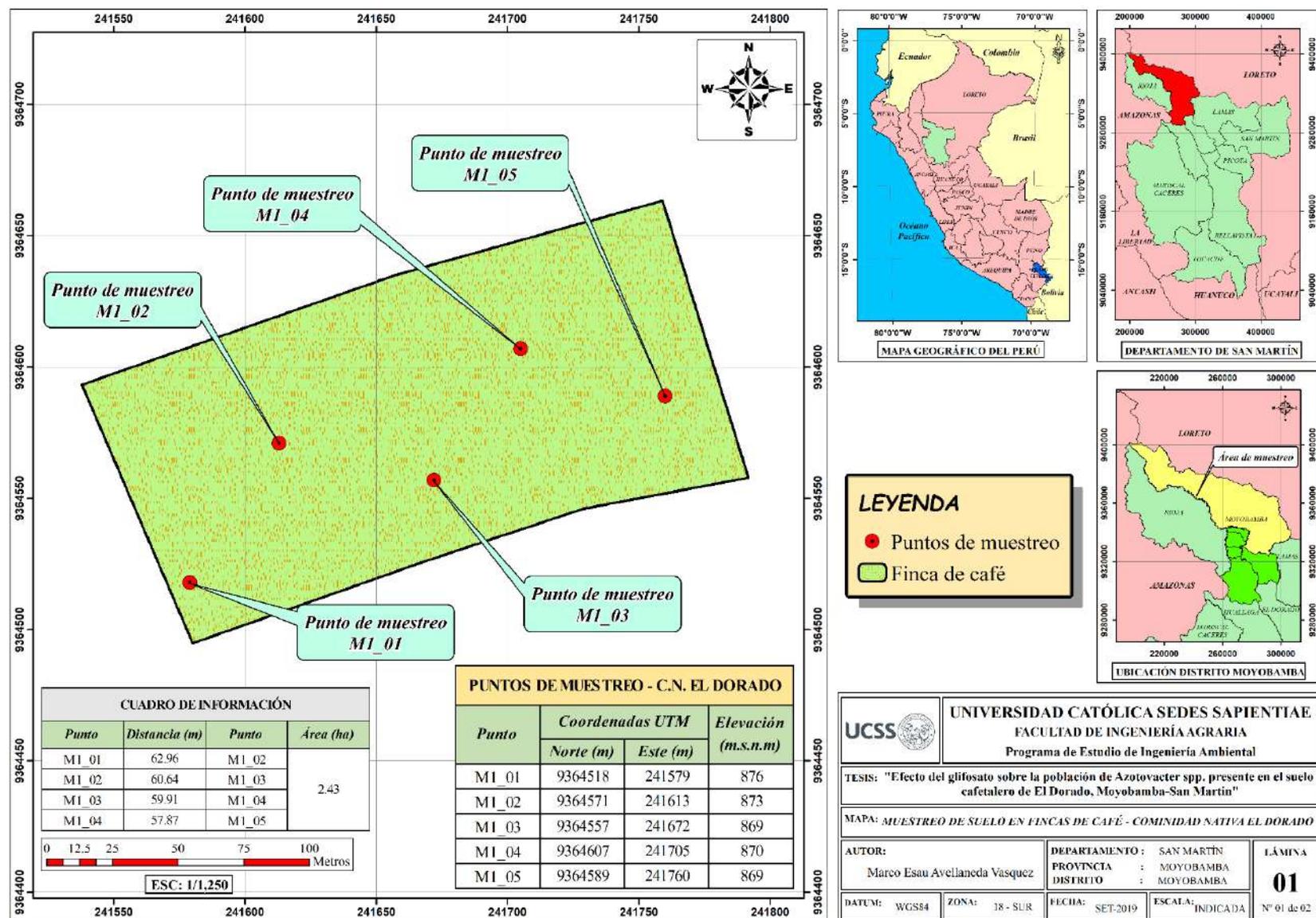


Figura 5. Muestreo de suelo en fincas de café de El Dorado. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3

Puntos de muestreo fincas de la comunidad nativa El Dorado

Puntos	Coordenadas UTM	
	Este	Norte
M1_01	241579	9364518
M2_02	241613	9364571
M3_03	241672	9364557
M4_04	241705	9364507
M5_05	241760	9364589

Fuente: Elaboración propia.

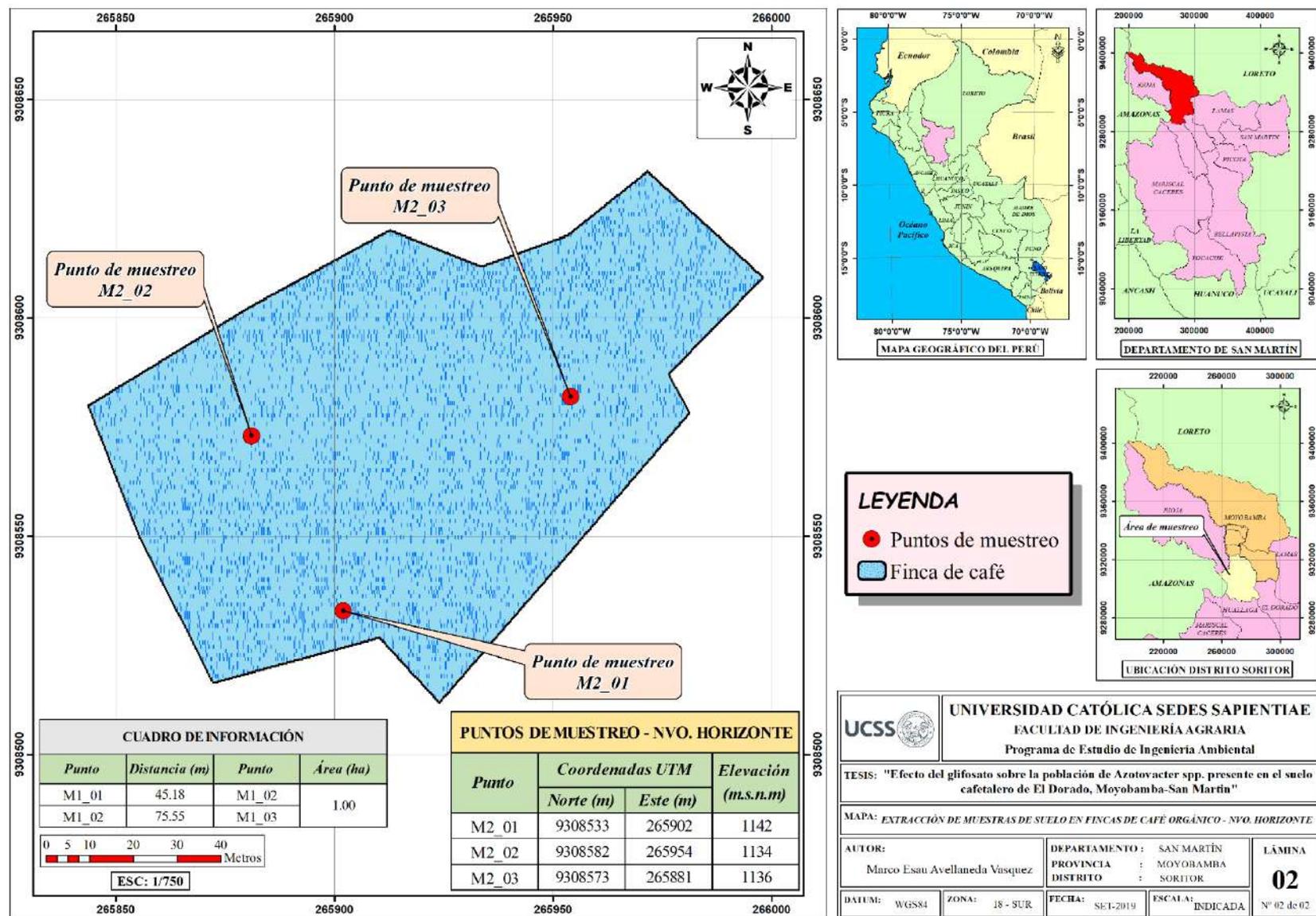


Figura 6. Muestreo de suelos en fincas de café de Soritor. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4

Puntos de muestreo en la finca El Alba

Puntos	Coordenadas UTM	
	Este	Norte
M1_01	265902	9308533
M2_02	265954	9308582
M3_03	265881	9308573

Fuente: Elaboración propia.

2.3. Descripción de la investigación

2.3.1. Fase preliminar

Se hizo un reconocimiento de las parcelas de café, finca El Alba y finca El Cedro para seleccionar de manera provisional los puntos de muestreo; además, se definió los laboratorios para los análisis de parámetros físicos y químicos del suelo e identificación de la molécula de glifosato.

2.3.2. Fase de campo

a. Obtención de muestras de suelo

Para el aislamiento e identificación de bacterias *Azotobacter*, las muestras de suelo cafetalero se obtuvieron de la finca El Alba (Figura 7 y 8). En la toma de muestras de suelo se siguió la Guía para el muestreo de suelos del Ministerio del Ambiente [MINAM], (2014) adaptando el siguiente procedimiento:

- Identificación de puntos de muestreo de la parcela en donde no se ha utilizado agroquímicos durante los últimos cinco años.
- Utilización de la indumentaria adecuada (guantes estériles, mascarillas, botas de jebe y vestimenta adecuada).
- Limpieza y acondicionamiento de cada punto identificado.

- Siguiendo a Hernández *et al.* (2018); Escobar *et al.* (2011) y García (2019) se colectó el suelo perteneciente a los cinco centímetros de profundidad.
- Luego se realizó el colocado de muestras en bolsas y el posterior rotulado de las mismas.

Una vez recogidas las muestras (5 kg de suelo) se trasladó al Laboratorio General de Ciencias Básicas N° 02 de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Filial Rioja: Nueva Cajamarca, fueron colocadas en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C.



Figura 7. Finca cafetalera El Alba. *Fuente:* Elaboración propia.



Figura 8. Toma de muestras de suelo, finca cafetalera El Alba. *Fuente:* Elaboración propia.

Para suministrar diversas dosis de glifosato y evaluar el comportamiento de la población de *Azotobacter* spp., se utilizó suelo cafetalero (cinco muestras) de la finca El Cedro con manejo convencional, el área de la parcela fue de 2,43 hectáreas ubicada en la comunidad nativa El Dorado distrito de Moyobamba (Figura 9). Para determinar si la muestra contiene la molécula

de glifosato se hizo un análisis de suelo en el laboratorio SGS de Perú SAC (ver Apéndice 3). Además, se realizó el análisis de parámetros físicoquímicos, en el Laboratorio de Suelos del PEAM – Nueva Cajamarca (ver Apéndice 4).



Figura 9. Toma de muestras de suelo, finca el Dorado. *Fuente:* Elaboración propia.

Una vez recogidas las muestras (15 kg de suelo) se trasladó al Laboratorio General de Ciencias Básicas N° 02 de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Filial Rioja: Nueva Cajamarca.

2.3.3. Fase de laboratorio

a. Acondicionamiento del lugar de trabajo

- Se solicitó una autorización para el uso del laboratorio de ciencias básicas de la Universidad Católica Sedes Sapientiae (ver Apéndice 1).

- Se construyó un invernadero de vidrio de 1 m de largo por 0,79 m de ancho y una altura de 0,40 m.

b. Aislamiento e identificación de bacterias

Para este proceso se tuvo en cuenta los siguientes pasos:

- Se procedió con la esterilización de materiales (placas Petri, Pinzas, Matraces y Vasos de precipitado) en un horno Pasteur por dos horas a 180 °C.
- Se preparó agar Ashby Manitol; este medio de cultivo está libre de nitrógeno (Figura 10 y Apéndice 2) y los microorganismos que crecen son considerados del género *Azotobacter* (Shahid *et al.*, 2019), la cantidad utilizada fue 4,07 g por cada 100 ml de agua destilada. Homogenizada la solución se vertió a un matraz para ser aforado con algodón y papel aluminio y luego ser llevado a esterilizar en autoclave durante 30 minutos a 121 °C y 0.11 megapascales (MPa).

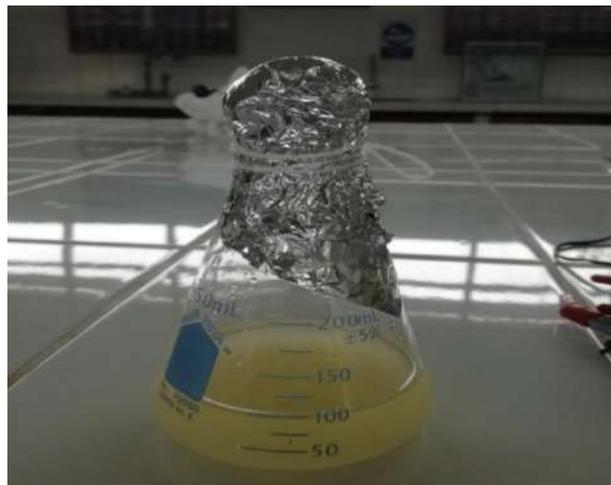


Figura 10. Preparación de agar Ashby Manitol. *Fuente:* Elaboración propia.

- Posteriormente se refrigeró durante 24 horas a 4 °C.
- Pasado el tiempo de refrigeración, el agar fue solubilizado haciendo uso de una cocina eléctrica, en seguida se agregó 20 ml a cada placa Petri.
- Siguiendo la técnica de gránulos de suelo (Aquilinti *et al.*, 2004, citado por Jiménez, 2007), se tomó 10 g de suelo, para posteriormente colocar 20 gránulos en cada placa a 1 cm de distancia entre los gránulos, se preparó un total de 26 placas Petri (Figura 11).



Figura 11. Técnica de los gránulos de suelo. Fuente: Elaboración propia.

- Las placas Petri se incubaron durante cuatro días a una temperatura de 28 °C (Figura 12) en las que se pudo verificar la pigmentación y colonias separadas, colonias traslúcidas y mucilaginosas; además se hizo uso de la tinción Gram para observar al microscopio diversas formas de bacterias del género *Azotobacter*. Se observó (Figura 13 y 14) formas celulares de bacilos, cocos, individuales, en pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable (Román *et al.*, 2014). De estas placas se realizó la identificación bioquímica evaluando el comportamiento químico de las bacterias frente a la fermentación de glucosa, maltosa, manitol y ramnosa (Jiménez, 2007), en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Universidad Católica Sedes Sapientiae (Aprendice 15).



Figura 12. Incubación de placas Petri. Fuente: Elaboración propia.

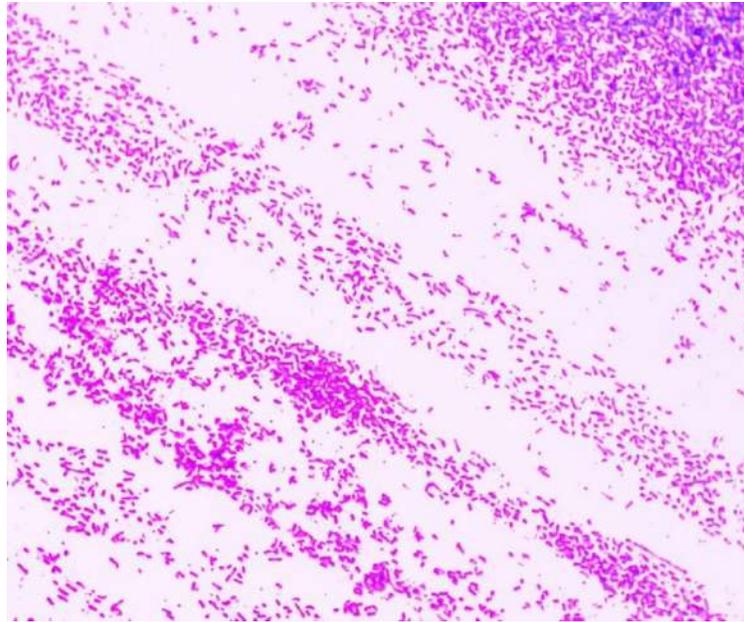


Figura 13. Vista de bacterias al microscopio. *Fuente:* Elaboración propia.

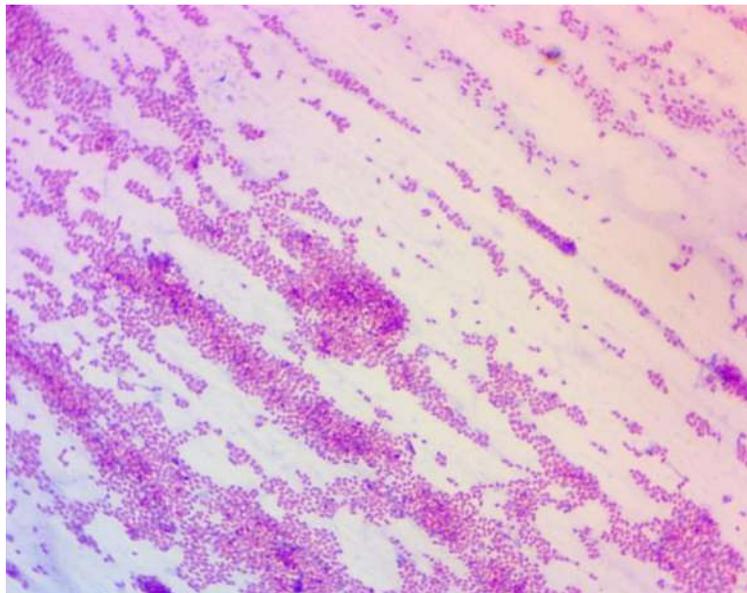


Figura 14. Formas de las bacterias observadas en el microscopio. *Fuente:* Elaboración propia

- Una vez identificadas las bacterias *Azotobacter* spp. se realizó la siembra de las bacterias por agotamiento en placa Petri (26 placas) con Agar Ashby Manitol a partir de las colonias antes aisladas (Figura 15).

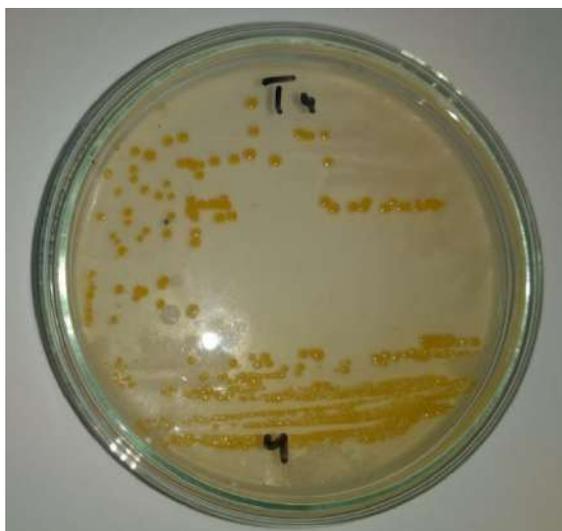


Figura 15. Crecimiento de bacterias en Agar Ashby Manitol. *Fuente:* Elaboración propia.

- Se incubó las placas Petri durante cuatro días a una temperatura de 28 °C hasta observar colonias traslúcidas y mucilaginosas (Shahid *et al.*, 2019).

c. Implementación de tratamientos para evaluación del glifosato

- Las muestras de suelo cafetalero de la finca El Cedro, pasaron por un proceso de secado en autoclave y luego se tamizaron (tamiz estándar de 4,75 mm) para obtener gránulos homogéneos.
- Con la ayuda de una balanza analítica se realizó el pesado de muestras de 0,5 kg, para ser colocados en vasos de precipitado de 500 ml dentro del invernadero (Figura 16).



Figura 16. Muestras de suelo en vasos de precipitado. *Fuente:* Elaboración propia.

- A cada muestra puesta dentro del invernadero se tomó la medición de pH, siguiendo el protocolo de Van Lierop (1981), citado por Jiménez (2007), según el cual se coloca suelo tamizado en un vaso de precipitado limpio y agua destilada en proporción 1:1 p/v; luego la proporción se dejó reposar durante cinco minutos y una vez preparada la muestra se tomó la medición del pH, haciendo uso de un pHmetro HI9811-5 marca HANNA.
- A cada vaso de precipitado con 500 g de suelo se agregó las siguientes cantidades del herbicida Octano según tratamiento (T) y sus repeticiones: para T1 se utilizó 1 g de glifosato diluido en 1 L de agua destilada, T2 se utilizó 5 g de glifosato diluido en 1 L de agua destilada, T3 se utilizó 10 g de glifosato diluido en 1 L de agua destilada, T4 se utilizó 15 g de glifosato diluido en 1 L de agua destilada y T5 se utilizó 20 g de glifosato diluido en 1 L de agua destilada.
- Una vez preparado el caldo según el tratamiento, se extrajo 200 ml para ser aplicado en un volumen de 50 ml cada 24 horas durante cuatro días, utilizando una pipeta milimétrica.
- Una vez terminado la aplicación del glifosato según tratamiento, las muestras de suelo se llevaron al laboratorio de suelos del PEAM de Nueva Cajamarca para el análisis de las propiedades físicas y químicas (ver Apéndices 5 - 9).

d. Recuento de colonias y agregado de gránulos de suelo con diferentes dosis de glifosato

- Se colocó mecheros de alcohol con llama, para que al momento de sacar las placas Petri de la incubadora se evite la contaminación directa o cruzada de las muestras que contenían las colonias de *Azotobacter* spp.
- Se realizó el primer recuento de las colonias bacterianas haciendo uso de equipo cuenta colonias J2 Colony Counter marca HINOTEK.
- Con la ayuda de pinzas metálicas estériles se sacaron gránulos de suelo con diversas dosis de glifosato para ser colocadas en las placas Petri de Agar Ashby-Manitol con colonias de *Azotobacter* spp. a una distancia de 1 cm entre sí (Figura 17).



Figura 17. Colocado de gránulos de suelo con diversas dosis de glifosato. *Fuente:* Elaboración propia.

- Las placas Petri fueron nuevamente puestas a incubación durante 7 días a una temperatura de 28 °C.
- Concluidos los 4 días de incubación se realizó un nuevo recuento de colonias para determinar si hubo incremento o disminución de estas, de modo que podamos evaluar así el efecto de las distintas dosis de glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. (Figura 18).



Figura 18. Recuento de colonias después de agregar suelo con diversas dosis de glifosato. *Fuente:* Elaboración propia.

2.3.4. Tratamientos

La investigación constó de cinco tratamientos y un control absoluto donde solo se le añadió agua. En total se acondicionó 26 vasos de precipitado que contenían 500 g de suelo procedente de la finca El Cedro, a los cuales se agregó la dosis de glifosato por tratamiento (Tabla 5).

Los tratamientos tuvieron como base la dosis comercial del producto del Herbicida Octano (1 kg/200 L de agua), además de una sub-dosis y tres sobredosis en las cuales se utilizaron un múltiplo de la dosis comercial. En cuanto a las dosis del herbicida glifosato se siguió cantidades crecientes empleadas por Martínez *et al.*, (2011).

Tabla 5

Tratamientos experimentales para evaluación del efecto del glifosato

Tratamiento	Dosis del producto comercial (kg/200 L)	Dosis / tratamiento (g/L)
T0 (control)	0	0
T1	0,5	1
T2	1(*)	5
T3	2	10
T4	3	15
T5	4	20

(*) Se tomó como base la dosis comercial del herbicida Octano según ficha técnica

Fuente: Elaboración propia.

2.3.5. Unidades experimentales

Cada tratamiento consistió en 5 unidades experimentales, cada unidad experimental estuvo representada por 1 vaso de precipitado que contenía 500 g de suelo por tratamiento en los cuales se añadió la dosis por tratamiento (Tabla 5). El experimento tuvo 26 unidades experimentales y un control absoluto que contenía solo agua. Las muestras de suelo con dosis de glifosato

permanecieron durante siete días dentro del invernadero, se colocó los gránulos de suelo dentro de las placas con Agar Ashby Manitol y se realizó el conteo de colonias.

2.3.6. Identificación de variables y su mensuración

Las variables de estudio se evaluaron de la siguiente manera (Tabla 6). El recuento de las bacterias *Azotobacter* spp. se realizó siguiendo la metodología empleada por Shahid *et al.*, (2019), en la cual se tomó una muestra de la colonia pigmentada de color marrón, se sembró en una placa Petri con Agar Ashby Manitol, las placas por tratamiento (Figura 15) fueron incubadas a una temperatura de 28 °C durante cuatro días y finalmente se realizó el conteo (ver Apéndice 13).

Tabla 6

Variables de investigación y su mensuración

Variables	Mensuración	Unidad de medida
Variable Dependiente: Población de <i>Azotobacter</i> spp.	Recuento de bacterias <i>Azotobacter</i> spp. siguiendo a Shahid <i>et al.</i>	UFC
Variable Independiente: Glifosato	Dosis de glifosato	g/L

Fuente: Elaboración propia.

2.3.7. Diseño estadístico del experimento

Se hizo uso del diseño completamente al azar (DCA), con cinco tratamientos y cinco repeticiones. La media de los valores obtenidos en los tratamientos se realizó mediante la prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

2.4. Materiales

2.4.1. Material biológico

Se logró aislar bacterias del género *Azotobacter* según formas y colores característicos en un medio libre de nitrógeno (Figura 19).



Figura 19. Bacterias del género *Azotobacter*. Fuente: Elaboración propia.

2.4.2. Herbicida Octano

Descripción

El herbicida Octano, fabricado por la empresa Montana S.A.C., tiene una composición de 880 mg/kg, es comercializado bajo la formulación de gránulos solubles, del grupo químico fosfonoglicinas en presentaciones de 1 kg (Apéndice 19).

Propiedades del producto

El ingrediente activo glifosato tiene una solubilidad en agua a 25 °C es de 15 700 mg/L a pH 7, con un punto de fusión de 189,5 °C, se descompone antes de la ebullición de 100 °C y no es volátil. Se recomienda el uso de dosis de 1 kg/200 L de agua (Apéndice 19).

Toxicidad

El glifosato es un plaguicida moderadamente tóxico para aves silvestres, anfibios, peces e invertebrados como las abejas. Su vida media en el suelo varía entre días e incluso años.

2.4.3. Materiales equipos

- Equipos de laboratorio: autoclave, estufa, congeladora, balanza, incubadora (Apéndice 20), contador de colonias (Apéndice 21), multiparámetro (Apéndice 22) y microscopio.
- Equipos de protección de bioseguridad: guardapolvo blanco, mascarilla, guantes y gafas.
- Materiales de laboratorio: papel aluminio, matraz, pipeta, probeta, algodón, placa Petri, mecheros y aza bacteriológica.
- Reactivos empleados: medio de cultivo Agar Ashby Manitol, alcohol, glifosato y agua destilada.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1. Determinación de la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro perteneciente a la comunidad nativa El Dorado

Según los resultados del análisis de suelo (Tabla 7) realizado por el Laboratorio SGS del Perú SAC a través del método de plaguicidas polares rápidos (method QuPPE) que implica extracción simultánea con metanol; la muestra de suelo obtenida de la finca El Dorado, con un Límite de Cuantificación (LOQ) de 0,01 no presenta valores detectables de Glifosato (ver Apéndice 3).

Tabla 7

Determinación de glifosato en suelo cafetalero

Muestra	Determinación	Unidad	Resultados	LOQ	Método de ensayo
1 kg suelo	Glyfosato	mg/kg	No detectable	0,01	Método de análisis de numerosos plaguicidas que implica extracción simultánea con metanol

Fuente: Laboratorio SGS del Perú SAC.

3.2. Identificación morfológica de cepas de *Azotobacter* spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor

3.2.1. Morfología de las colonias

En los aislamientos realizados se evidenció dos morfologías diferentes de las colonias (Figura, 20). El 95 % de las colonias observadas en las placas, incubadas a una temperatura de 28 °C a

partir de las 48 horas presentaron color amarillento, con aspecto mucilaginoso brillante, medianas y grandes viscosas, con bordes redondos e irregulares; mientras que, un 5 % presentó color blanco translucido no mucilaginoso.

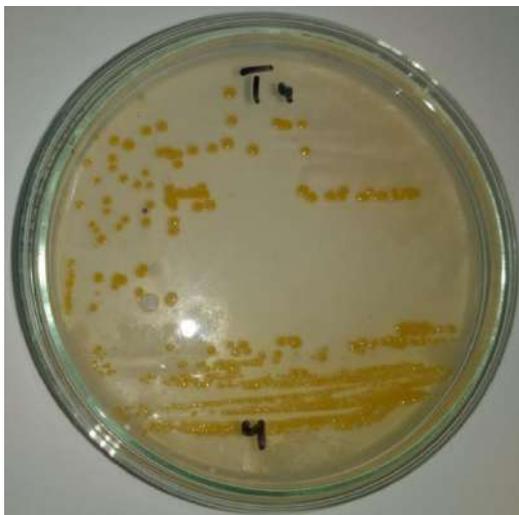


Figura 20. Morfología de bacterias del género *Azotobacter*. *Fuente:* Elaboración propia.

3.2.2. Morfología de las bacterias

Mediante la coloración Gram se logró identificar dos morfologías celulares, bacilos Gram negativos ovalados, grandes, gruesos y alargados y bacilos Gram negativos cortos o pequeños. Ambas morfologías presentaron forma de bacilos hasta cocos, individuales, en pares o formando agregados irregulares, y algunas veces formando cadenas de tamaño variable (Figura 20 y 21).

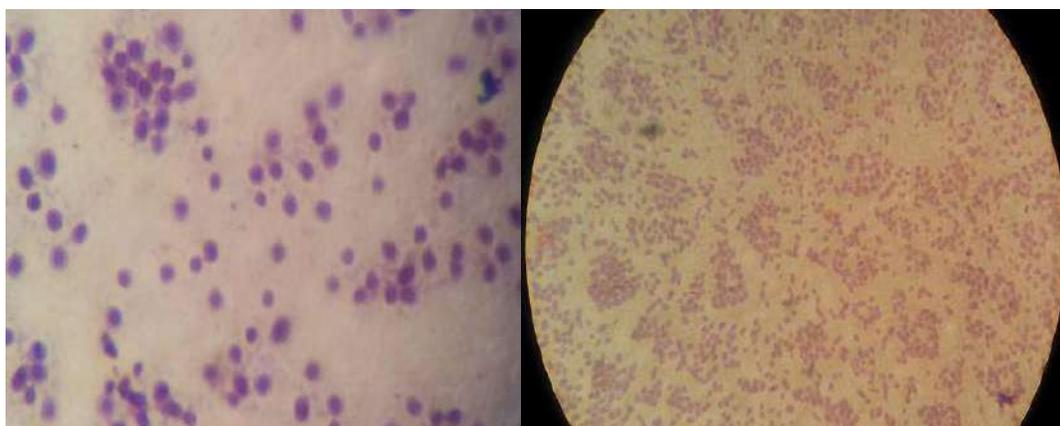


Figura 21. Bacilos Gram negativos del género *Azotobacter*. *Fuente:* Esqueche y Quispe (2017).

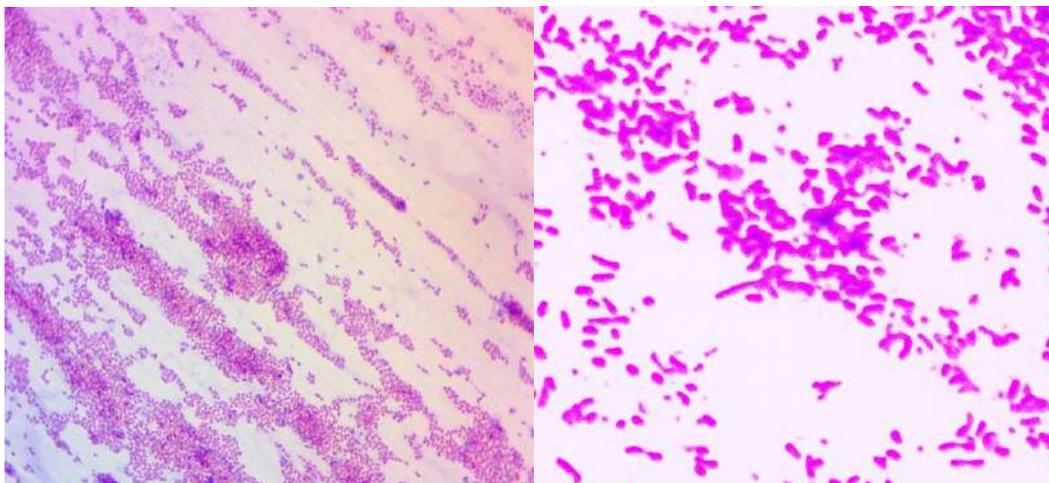


Figura 22. Bacterias del género *Azotobacter*. Fuente: Elaboración propia.

3.3. Identificación bioquímica de cepas de *Azotobacter* spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor

La Tabla 8 y Apéndice 15 se muestran los resultados de la prueba bioquímica de lectura inmediata de identificación a nivel de género de la bacteria *Azotobacter*, este tipo de prueba permitió determinar las características metabólicas de las bacterias. Las cepas tuvieron resultados positivos utilizando la técnica de tinción Gram, debido a que estos microorganismos tienen una capa gruesa de peptidoglicano en su pared. El tipo de célula según su forma fue bacilos rectos y cocos en forma de bastones, la reacción ante las enzimas catalasa y oxidasa fueron positivas por la presencia de citocromos; es decir, la reacción oxidasa positiva ocurre en microorganismos capaces de desarrollarse y reproducirse en presencia de O_2 y producir en paralelo la enzima catalasa. Las bacterias también mostraron capacidad para fermentar glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa y reducción de nitratos dando positivo en todas las reacciones.

Tabla 8

Características de las bacterias del género Azotobacter

Características	<i>Azotobacter</i>
Células	Bacilos rectos
Coloración de Gram	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Acidificación de:	
- Glucosa	+
- Sacarosa	+
- Fructosa	+
- Maltosa	+
Reducción de nitratos	+

Fuente: Laboratorio de Microbiología y Biotecnología UCSS.

3.4. Evaluación de los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero

3.4.1. Análisis físico químico del suelo cafetalero sin glifosato de la finca cafetalera El Cedro

En la Tabla 9, se muestran los valores del análisis de parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo sin emplear el herbicida glifosato. La clase textural fue franco, el valor de pH 5.23, la materia orgánica 3.10 %, nitrógeno 0.14 %, fósforo 22.86 ppm y potasio 29.27 ppm; se observa igualdad en los resultados por parámetros de los 5 tratamientos.

Tabla 9

Datos del análisis físico químico del suelo sin glifosato

Muestra	Clase textural	pH	CE (ds/m)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	CIC
T1	Franco	5,23	0,00098	3,10	0,14	22,86	29,27	16,28
T2	Franco	5,23	0,00098	3,10	0,14	22,86	29,27	16,28
T3	Franco	5,23	0,00098	3,10	0,14	22,86	29,27	16,28
T4	Franco	5,23	0,00098	3,10	0,14	22,86	29,27	16,28
T5	Franco	5,23	0,00098	3,10	0,14	22,86	29,27	16,28

Fuente: Laboratorio de Suelos del PEAM – Nueva Cajamarca.

3.4.2. Análisis físico químico del suelo cafetalero con glifosato de la finca cafetalera El Cedro

En la Tabla 10, se muestran los valores promedios del análisis de parámetros fisicoquímicos de las muestras de suelo con diversas dosis de glifosato empleadas (ver Apéndice 10). La clase textural fue franca, el valor del pH presentó un límite superior de 5,23 y un límite inferior de 3,88 es decir mientras mayor fue el incremento de la dosis de glifosato las muestras de suelo tuvieron un pH más ácido. Respecto a la materia orgánica el promedio se mantuvo en 3,10 % para todas las muestras, registrándose una ligera variación en el tratamiento 3 y 5 0,29 % de los demás tratamientos 0,28% respecto al nitrógeno.

Tabla 10

Datos del análisis físico químico del suelo con glifosato

Muestra	Dosis de glifosato (g)	Clase textural	pH	CE (ds/m)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	CIC
T1	1	Franco	5,23	12,32	3,10	0,28	14,96	132,80	12,32
T2	5	Franco	5,00	13,02	3,10	0,28	19,56	84,21	13,02
T3	10	Franco	4,64	13,60	3,10	0,29	16,40	107,86	13,60
T4	15	Franco	4,27	11,87	3,10	0,28	16,36	79,35	11,87
T5	20	Franco	3,88	11,24	3,10	0,29	17,74	55,38	11,24

Fuente: Laboratorio de Suelos del PEAM – Nueva Cajamarca.

3.4.3. Evaluación de los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero

En la Tabla 11 se observan los estadísticos descriptivos (media, desviación estándar, coeficiente de variación y mediana) de pH por dosis de glifosato. La media más alta 5,232 es para T1 que tuvo la dosis de glifosato con menor concentración 1 g/L en 500 g de suelo y la media más baja 3,878 es para T5 cuya concentración de glifosato fue la más alta 20 g/L en 500 g de suelo, expresando que existe una progresiva acidificación del pH del suelo respecto al incremento de las dosis de glifosato empleadas. En el tratamiento T2 al que se le aplicó 5 g de glifosato, la desviación estándar tuvo mayor dispersión de datos con 0,5688 respecto a los demás tratamientos, esto también influyó para que el coeficiente de variación de T2 sea el mayor (11,37%).

Tabla 11

Estadísticos descriptivos de pH por dosis de glifosato

Muestra	Dosis	n	Media	Desviación estándar	CV	Mediana
T1	1 g	5	5,232	0,0084	0,16 %	5,23
T2	5 g	5	5,002	0,5688	11,37 %	4,93
T3	10 g	5	4,644	0,1946	4,19 %	4,56
T4	15 g	5	4,270	0,2191	5,13 %	4,43
T5	20 g	5	3,878	0,0798	2,06 %	3,90

Nota. CV = Coeficiente de variación que se obtiene desviación estándar entre la media, n es cantidad de muestras por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

La Figura 24 representa la variabilidad de los datos del pH según las dosis del glifosato respecto a la media, expresando los valores promedio de las cinco dosis de glifosato suministradas por cada tratamiento; además, la mayor dispersión (11,37 %) se visualiza en la dosis de 5 g y existe una dispersión bastante reducida (0,16 %) en la dosis de 1 g.

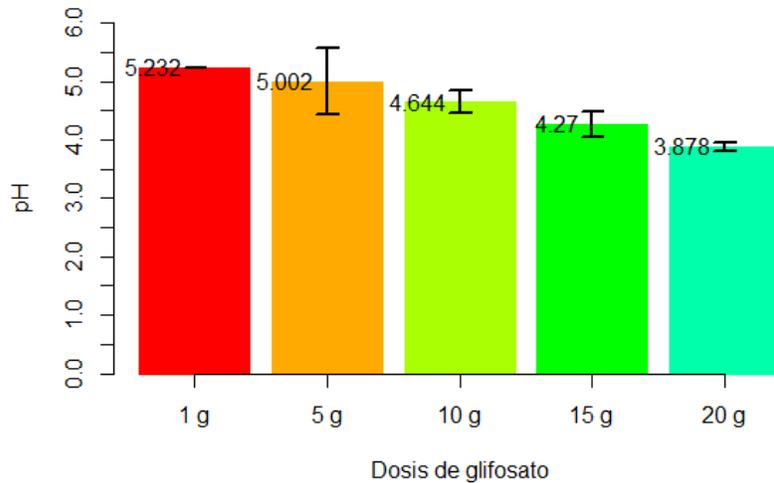


Figura 23. pH promedio para cada una de las cinco dosis de glifosato.

Nota. I (barras de error). Fuente: Elaboración propia.

La Figura 25 muestra la aproximación de los datos de pH a una distribución normal, aparentemente se evidencia una distribución normal, la misma que deberá ser contrastada con la prueba de normalidad.

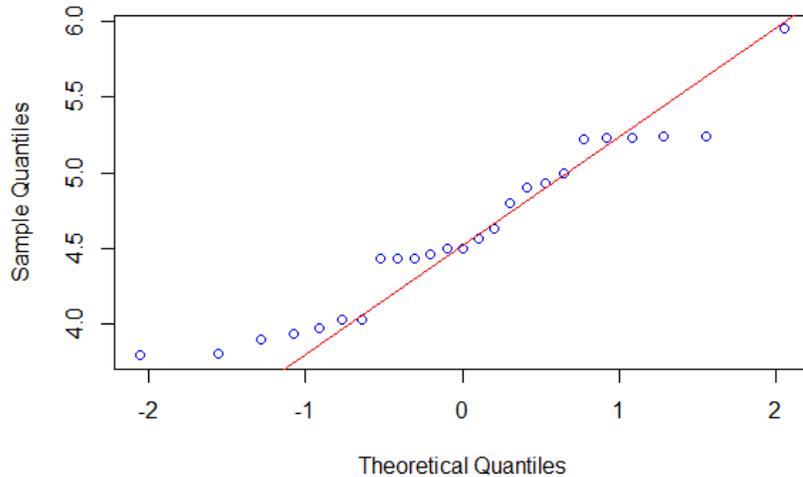


Figura 24. Visualización de la normalidad del conjunto de datos.

Nota. Cuantiles muestrales (Sample quantiles) y cuantiles teóricos (Theoretical quantiles). Fuente: Elaboración propia.

El pH se distribuye aproximadamente como una distribución normal ($p > 0,05$), supuesto necesario para el análisis de varianza de un experimento (Tabla 12).

Tabla 12

Prueba de normalidad para el pH a diferentes dosis de glifosato

Test de Normalidad de Shapiro-Wilk

data: pH

W = 0,94327, p-value = 0,1761

Nota: $p > 0,05$, los datos proceden de una distribución normal

Fuente: Elaboración propia.

La Figura 26 expresa la dispersión existente en los datos dentro de los valores encontrados en el experimento; es decir, existe mayor dispersión en la dosis de 10 g.

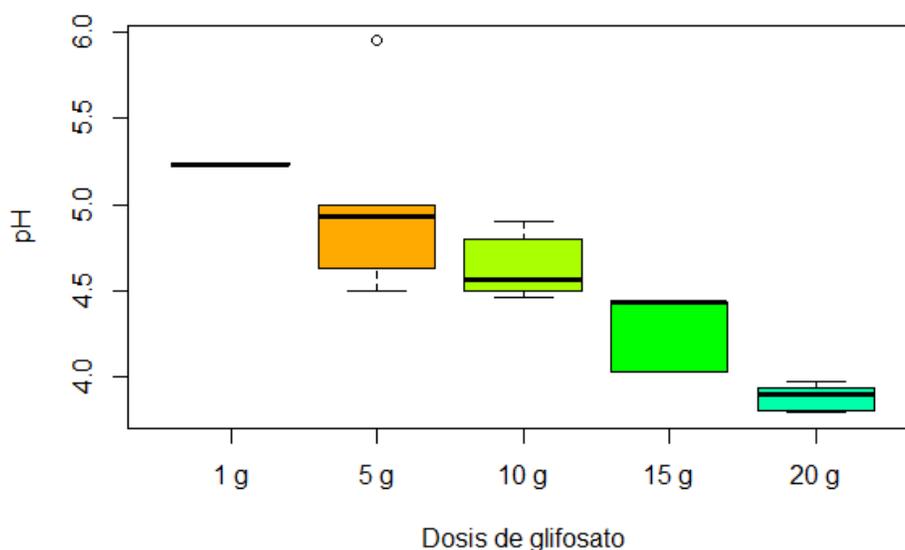


Figura 25. Boxplot del pH en cada una de las dosis de glifosato.

Nota: El boxplot permite visualizar la dispersión de los datos.

Fuente: Elaboración propia.

La prueba de homogeneidad de varianzas del pH muestra una dispersión significativa ($p < 0,05$), lo que indica que no se está cumpliendo el supuesto de homocedasticidad para el análisis de varianza paramétrico (Tabla 13).

Tabla 13

Prueba de homogeneidad de varianzas de pH entre diferentes dosis de glifosato

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")		
Df	F value	Pr(>F)
group 4	3,3805	0,02877 *
20		

Nota: Signif. codes: 0 '****' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 ' ' 1

Fuente: Elaboración propia.

Ya que no se cumple con el supuesto de homogeneidad, se utilizó el análisis de varianza no paramétrico, Kruskal-Wallis que compara más de dos grupos utilizando las medianas las cuales no están afectadas por los valores extremos. Las medianas en las dosis de glifosato experimentadas son significativamente diferentes ($p < 0,05$), en al menos una de las cinco dosis (Tabla 14).

Tabla 14

Análisis de varianza del pH con cinco diferentes dosis de glifosato

Kruskal-Wallis rank sum test
data: pH by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 21,409, df = 4, p-value = 0,0002627

Nota: p-value < 0.05, df= degrees of freedom (grados de libertad).

Fuente: Elaboración propia.

La tabla 15 muestra la prueba de comparaciones múltiples para saber en qué grupos de dosis de glifosato el pH es diferente de manera significativa. Los datos muestran que en el grupo 3 donde la concentración fue de 1/L g y 15 g/L de glifosato por 500 g de suelo existe diferencia significativa ($p > 0,05$); en el grupo 4 donde las concentraciones fueron 1/L g y 20 g/L de glifosato por 500 g de suelo existe diferencia significativa ($p > 0,05$) y por último en el grupo 7 donde las concentraciones fueron 5/L g y 20 g/L de glifosato por 500 g de suelo también existe diferencia significativa ($p > 0,05$).

Tabla 15

Comparaciones múltiples entre el pH de las cinco dosis de glifosato

Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis				
Grupos	p.value: 0,05 Comparaciones	obs.	dif critical.	dif difference
1	1 g-5 g	4,1	13,06603	FALSE
2	1 g-10 g	7,9	13,06603	FALSE
3	1 g-15 g	14	13,06603	TRUE
4	1 g-20 g	19	13,06603	TRUE
5	5 g-10 g	3,8	13,06603	FALSE
6	5 g-15 g	9,9	13,06603	FALSE
7	5 g-20 g	14,9	13,06603	TRUE
8	10 g-15 g	6,1	13,06603	FALSE
9	10 g-20 g	11,1	13,06603	FALSE
10	15 g-20 g	5,0	13,06603	FALSE

Nota: Diferencia promedio de los rangos (Obs.dif), Valor crítico para considerar una diferencia significativa (Critical.dif). *Fuente:* Elaboración propia.

3.5. Evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro en condiciones de invernadero

En la Tabla 16 se muestran la cantidad de colonias encontradas en promedio por cada tratamiento sin la aplicación de glifosato por placa Petri posterior a 4 días de incubación después de la siembra. Para T1, el promedio más alto (92 colonias) estuvo en la repetición 1 y el promedio más bajo (82 colonias) en la repetición 4. En el tratamiento T2, el promedio más alto (104 colonias) estuvo en la repetición 5 y el promedio más bajo (87 colonias) en la repetición 2. En el tratamiento T3, el promedio más alto (104 colonias) estuvo en la repetición 3 y los promedios más bajos (80 colonias) en las repeticiones 1 y 2. En el tratamiento T4, el promedio más alto (113 colonias) estuvo en la repetición 5 y los promedios más bajos (89 colonias) en las repeticiones 1 y 2. Finalmente en el tratamiento T5, los promedios más altos (99 colonias)

estuvieron en las repeticiones 1 y 4 y el promedio más bajo (95 colonias) en la repetición 2. El punto de partida de la investigación no es homogéneo.

Tabla 16

Número de colonias por placa Petri después de 4 días de incubación

Recuento de colonias sin glifosato					
Repeticiones	Número de colonias por tratamiento				
	T1	T2	T3	T4	T5
1	92	91	80	89	99
2	87	87	80	89	95
3	91	92	104	101	98
4	82	88	89	107	99
5	83	104	87	113	97

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 17 se muestran la cantidad de colonias muertas en promedio por cada tratamiento después de 7 días de la aplicación de glifosato. Para T1 donde la concentración fue de 1g, el promedio más alto de muertes (28 colonias) estuvo en la repetición 2 y el promedio más bajo (25 colonias) en la repetición 4. En el tratamiento T2 donde la concentración fue de 5 g el promedio más alto (50 colonias) estuvo en la repetición 2 y el promedio más bajo (39 colonias) en la repetición 3. En el tratamiento T3 donde la concentración fue de 10 g el promedio más alto (59 colonias) estuvo en la repetición 2 y el promedio más bajo (50 colonias) en la repetición 3. En el tratamiento T4 donde la concentración fue de 15 g el promedio más alto (79 colonias) estuvo en la repetición 3 y los promedios más bajos (75 colonias) en las repeticiones 2 y 4. Finalmente en el tratamiento T5 donde la concentración fue de 20 g los promedios más altos (96 colonias) estuvieron en las repeticiones 4 y 5 y el promedio más bajo (92 colonias) en la repetición 2.

Tabla 17

Número de colonias muertas por placa Petri según dosis de glifosato

Repeticiones	Número de colonias muertas según dosis de glifosato (g) por tratamiento				
	1 g-T1	5 g-T2	10 g-T3	15 g-T4	20 g-T5
1	27	46	56	76	94
2	28	50	59	75	92
3	27	39	50	79	95
4	25	41	57	75	96
5	26	47	58	78	96

Fuente: Elaboración propia.

Se observa los estadísticos descriptivos de la muerte de colonias después de 7 días de haberse aplicado las diferentes dosis de glifosato (Tabla 18). El promedio más alto fue para el tratamiento T5 (94,6 colonias muertas) y el promedio más bajo para el tratamiento T1 (26,6 colonias muertas), expresando que existe un progresivo efecto de disminución de las colonias en cada placa según se incrementa la dosis. Respecto a la Desviación Estándar, el tratamiento T2 fue el más alto (4,5056) seguido por el tratamiento T3 (3,5355) es decir estos dos tratamientos tuvieron mayor dispersión en comparación a los demás tratamientos, influenciando también en los valores del Coeficiente de Variación de estos T2=10,10 % y T3=6,31 %.

Tabla 18

Estadísticos descriptivos de muertes de colonias por dosis de glifosato

Tratamiento	Dosis (g)	n	Media	Desviación estándar	CV	Mediana
T1	1	5	26,6	1,1402	4,29 %	27
T2	5	5	44,6	4,5056	10,10 %	46
T3	10	5	56,0	3,5355	6,31 %	57
T4	15	5	76,6	1,8166	2,37 %	76
T5	20	5	94,6	1,6733	1,77 %	95

Nota. CV = Coeficiente de variación que se obtiene desviación estándar entre la media, n es cantidad de muestras por tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

Se representa la variabilidad de datos respecto a su media indicando las muertes de colonias bacterianas del género *Azotobacter* según dosis de glifosato suministrada (Figura 27). La mayor dispersión (10,10 %) se expresa en el grupo de 5 g y la más reducida (1,77 %) se encuentra en el grupo de 20 g.

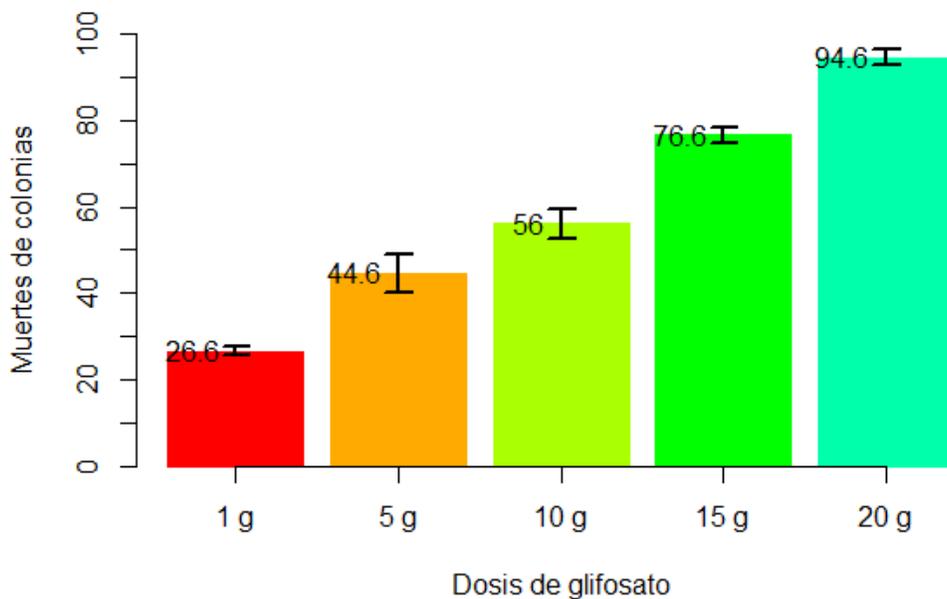


Figura 26. Muertes promedio de colonias para cada una de las cinco dosis de glifosato.

Nota: Las barras de error representan la variabilidad de los datos respecto a su media.

Fuente: Elaboración propia.

El conjunto de los datos se aproxima a una distribución normal (Figura 28) mostrando una aparente normalidad.

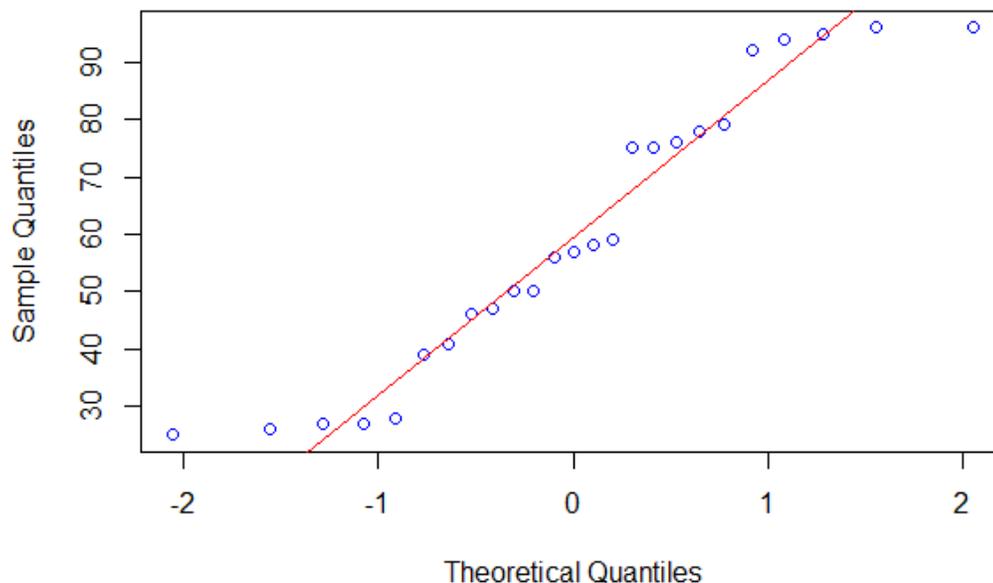


Figura 27. Visualización de la normalidad del conjunto de datos.

Nota. Cuantiles muestrales (Sample quantiles) y cuantiles teóricos (Theoretical quantiles).
Fuente: Elaboración propia.

Las muertes de colonias bacterianas no se distribuyen como una distribución normal ($p > 0,05$), supuesto necesario para el análisis de varianza (Tabla 19).

Tabla 19

Prueba de normalidad para muertes de colonias a diferentes dosis de glifosato

Shapiro-Wilk normality test

data: Muertes

W = 0,91793, p-value = 0,04598

Nota: $p < 0,05$, los datos no proceden de una distribución normal.

Fuente: Elaboración propia.

El conjunto de los datos encontrados en el experimento expresa mayor dispersión y un dato atípico se muestra en la dosis de 10 g (Figura 29).

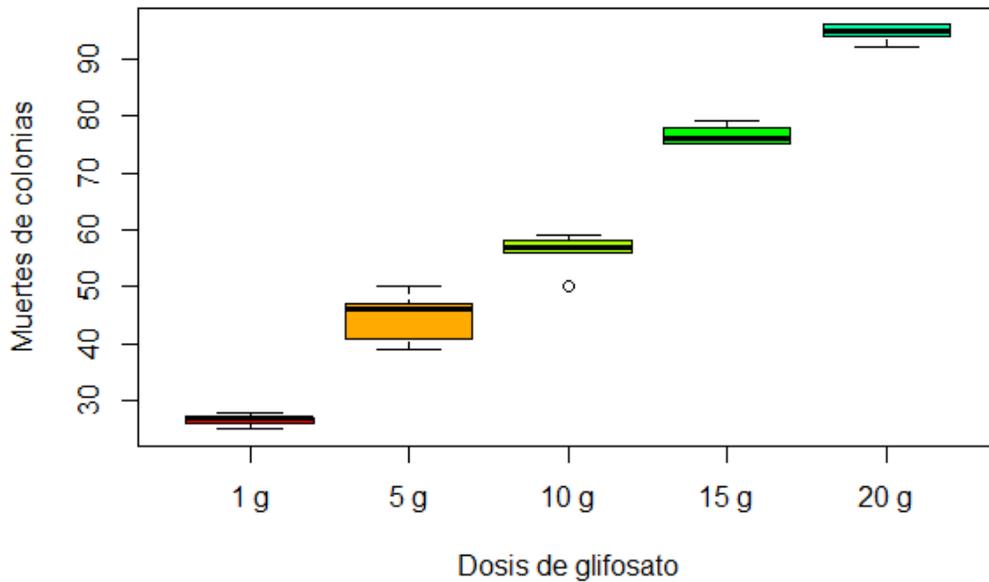


Figura 28. Boxplot de muertes de colonias en cada una de las dosis de glifosato. Fuente: Elaboración propia.

La prueba de homogeneidad de varianzas de las muertes de colonias muestra una dispersión significativa ($p < 0,05$) lo cual indica que no se cumple este supuesto para un análisis de varianza paramétrico (Tabla 20).

Tabla 20

Prueba de homogeneidad de muertes de colonias y diferentes dosis de glifosato

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")		
Df	F value	Pr(>F)
group 4	3,0574	0,0406 *
20		

Nota: Signif. codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

Fuente: Elaboración propia.

Como no se cumplen los supuestos se utiliza la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 20), obteniendo como resultado que existe diferencias significativas ($p < 0,05$) en al menos una de las cinco dosis.

Tabla 21

Análisis de varianza de las muertes de colonias con cinco dosis de glifosato

Kruskal-Wallis rank sum test

data: Muertes by Tratamiento

Kruskal-Wallis chi-squared = 23,022, df = 4, p-value = 0,0001254

Note: p-value<0,05, df= degrees of freedom (grados de libertad).

Fuente: Elaboración propia.

La tabla 22 muestra la prueba de comparaciones múltiples para saber en qué grupos de dosis de glifosato la muerte de colonias es diferente de manera significativa. Los datos muestran que en el grupo 3 donde la concentración fue de 1 g/L y 15 g/L de glifosato existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en la muerte de colonias de *Azotobacter* spp. después de los 7 días; en el grupo 4 donde las concentraciones fueron 1 g/L y 20 g/L de glifosato existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en la muerte de colonias de *Azotobacter* spp. después de los 7 días y por último en el grupo 7 donde las concentraciones fueron 5 g/L y 20 g/L de glifosato también existe diferencia significativa ($p > 0,05$) en la muerte de colonias de *Azotobacter* spp. después de los 7 días.

Tabla 22

Comparaciones múltiples entre muertes de colonias y cinco dosis de glifosato

Prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis

Grupos	p-value: 0,05 Comparaciones	obs.	dif critical.	dif difference
1	1 g-5 g	5,1	13,06603	FALSE
2	1 g-10 g	9,9	13,06603	FALSE
3	1 g-15 g	15	13,06603	TRUE
4	1 g-20 g	20	13,06603	TRUE
5	5 g-10 g	4,8	13,06603	FALSE
6	5 g-15 g	9,9	13,06603	FALSE
7	5 g-20 g	14,9	13,06603	TRUE
8	10 g-15 g	5,1	13,06603	FALSE

Continuación

9	10 g-20 g	10,1	13,06603	FALSE
10	15 g-20 g	5	13,06603	FALSE

Nota: obs.dif=diferencia promedio de los rangos. Critical.dif=valor crítico para considerar una diferencia significativa (diference).

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO IV: DISCUSIONES

4.1. Determinación de la presencia de glifosato en el suelo de la finca cafetalera El Cedro perteneciente a la comunidad nativa El Dorado

El glifosato dio valores no detectables con un límite de cuantificación de 0,01 mg/kg en el análisis realizado en laboratorio SGS del Perú (Tabla 6). Sin embargo, diversos autores demostraron que las moléculas de glifosato se mantienen en el suelo por meses, según condiciones climáticas y características del suelo (Montero *et al.*, 2017 y Ansari *et al.*, 2019), al adherirse con la materia orgánica y la arcilla (Sidoli *et al.*, 2015; Sousa *et al.*, 2019) y para ser adsorbido necesita de suelos con mayor cantidad de materia orgánica (Pérez *et al.*, 2013).

Las condiciones climáticas como las lluvias frecuentes, debido a la lixiviación, trasladarían esta sustancia (Rivera, 2018 y Camino y Aparicio, 2010) y la actividad microbiana podría disiparla en forma de carbono, nitrógeno y fósforo; se ha demostrado que la degradación microbiana es una de las formas para descomponer los residuos de herbicidas (Bórtoli *et al.*, 2012). Además, existe riesgo potencial que este compuesto afecte los ciclos biológicos del suelo (Ansari *et al.*, 2019). Y, considerando el suelo como un sistema dinámico vivo que contiene muchas enzimas que participan en reacciones de adsorción, oxidación, reducción, hidrólisis y complejación; los herbicidas van a influir en cambios temporales de carácter e intensidad sobre la actividad de los microorganismos del suelo (Santric *et al.*, 2018).

4.2. Identificación morfológica y bioquímica de cepas de *Azotobacter* spp. a nivel de género, presente en suelos cafetaleros de la zona de Soritor

Las colonias de las bacterias del género *Azotobacter* después de las 48 horas de incubación a 28 °C presentaron colores amarillentos y mucilaginosos transparentes, al realizar la tinción a través de microscopía óptica fueron Gram negativas y se presentaron en formas de bacilos de diversos tamaños. Estos resultados concuerdan con diversos autores (Tejera *et al.*, 2005; Aquilanti *et al.*, 2004; Valderrama, 2013; Román *et al.*, 2014; García, 2019 y Shahid *et al.* 2019), los cuales al incubar placas Petri con Agar Ashby que contenían cepas de *Azotobacter* por 48 y 72 horas a 28 °C las colonias presentaron el fenotipo mucosas y color blanquecino, mucilaginoso transparente, marrón mucilaginoso y bordes redondeados e irregulares; otros investigadores como Jnawail *et al.*, (2015), Esqueche y Quispe (2017) y Kumar *et al.*, (2019) mostraron que las bacterias del género *Azotobacter* son Gram negativas, viven en presencia de oxígeno, tienen formas diversas como bacilos y cocos.

El género de bacterias *Azotobacter* se identificó bioquímicamente mediante pruebas como movilidad, coloración de Gram, catalasa, oxidasa, reducción de nitratos y acidificación de glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa con valores positivos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por (Vélez y Orellana y 2010 León y Rojas, 2015) que de acuerdo con pruebas bioquímicas determinaron que *Azotobacter* poseen enzimas catalasa, oxidasa, ureasa, amilasa, utiliza citrato como fuente de carbono y es Gram negativa.

4.3. Evaluación de los cambios de pH del suelo de la finca cafetalera El Cedro bajo cinco concentraciones de glifosato en condiciones de invernadero

El pH, tomado como referencia antes de aplicar ningún tratamiento y según análisis de laboratorio, ha dado un valor de 5,23 considerado relativamente ácido. Con la aplicación de los tratamientos se ha dado una constante disminución del pH, debido a que las concentraciones altas de glifosato, al degradarse son liberados los grupos amino, siguen reacciones y liberan

iones H^+ que acidifican el suelo (Florida *et al.*, 2012). El mismo autor considera que esto es común en los suelos tropicales.

Las mayores diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre la disminución del pH al suministrar diversas dosis de glifosato a las muestras de suelo encontradas en el análisis de comparaciones múltiples fueron en los grupos 1 y 15 g (14,0), 1 y 20 g (19,0) así como en 5 y 20 g (14,9). Estos valores de pH decrecientes se atribuyen a procesos de disociación ácido-base según composición mineralógica del suelo (Ramos, 2016). Por otro lado, mencionan que la adsorción de la molécula de glifosato a las partículas del suelo disminuye con el incremento en el pH, puesto que la adsorción de aniones esta acoplada a la liberación de iones OH^- , es decir la adsorción se encuentra favorecida a pH bajos; los mismos autores mencionan también, que disminución temporal de pH en el suelo se debe a la carga sobre la molécula debido a los procesos de disociación ácido-base y a la carga superficial de los adsorbentes (Camino y Aparicio, 2010).

Al darse un proceso de acidificación temporal en el suelo según el experimento realizado en condiciones controladas podría afectar considerablemente el desarrollo de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Lara *et al.*, 2007). Pues estos microorganismos viven en medios de suelo cercanos a pH neutro (Salazar y Aldana, 2011).

4.4. Evaluación del del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo cinco concentraciones de glifosato aplicado al suelo de la finca cafetalera El Cedro en condiciones de invernadero

Los herbicidas no han sido hechos para inhibir microorganismos, pero algunos podrían ser una amenaza para la población microbiana (Rivera, 2018). Específicamente, el glifosato en su formulación comercial afectó de manera significativa según dosis suministradas disminuyendo la población de microorganismos fijadores de nitrógeno *Azotobacter* spp. ($KW = 23,022$, $p\text{-value} = 0,0001254$). Existe una disminución del número de colonias (Tabla 15 y 16) del género

Azotobacter a medida que se aplica las dosis de glifosato cuya toxicidad fue experimentada por investigadores como Shahid *et al.* (2019) al afirmar que dosis altas de glifosato pueden producir rupturas en las membranas e incluso muerte celular, disminuyendo significativamente la población porcentual (41 %) de bacterias debido a la solubilidad, movilidad y absorción del compuesto. Del mismo modo Bórtoli *et al.* (2012) observaron que a medida que aumenta la concentración del glifosato, el número de microorganismos Gram negativas fijadores de nitrógeno disminuye, debido a la alteración en la biomasa y la actividad microbiana y al alto grado de sensibilidad que presentan las bacterias frente a las moléculas del glifosato.

Conde (2011) determinó que el glifosato en función de la dosis utilizada tuvo un efecto negativo sobre la densidad de poblaciones benéficas de *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma harzianum* debido a la alteración de las interacciones de los microorganismos, favoreciendo el patógeno en detrimento del antagonista. El glifosato no solo afecta poblaciones de bacterias del género *Azotobacter*, al suministrarse diversas dosis de este compuesto al suelo afecta también a otras poblaciones de bacterias y hongos; además, incrementa la temperatura, el pH y la materia orgánica, propiedades del suelo que condicionan el desarrollo de la microbiología edáfica (Florida *et al.*, 2012). Se ha visto una disminución significativa de la población de las bacterias *Azotobacter* según las dosis de glifosato empleadas en cada tratamiento, sobre todo durante las 48 h después de aplicado el herbicida. Conde (2011) y Bailón *et al.*, (2015) mostraron resultados similares en estudios acerca de los efectos de herbicidas sobre la diversidad microbiana del suelo y demostraron que el uso intensivo del glifosato en los terrenos de cultivo trae consigo la escasez de los microorganismos del suelo.

Las bacterias del género *Azotobacter* tienen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en amonio para que este elemento pueda ser asimilado (Lara *et al.*, 2007). Por lo tanto, estos microorganismos que se desarrollan en suelos de diversos ecosistemas donde no se utilizan plaguicidas, favorecen la fertilización de los suelos y el desarrollo vegetativo de las plantas (floración, altura, volumen radicular, etc.) incluyendo la cantidad y calidad de la producción (Escobar *et al.*, 2011 y Florida *et al.*, 2012). La investigación, conservación y propagación de

estos microorganismos favorecerán la conservación de los suelos y la calidad de los productos, de modo que se vaya practicando una agricultura ecológica.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- El suelo cafetalero de la comunidad nativa El Dorado presenta cantidades de glifosato no detectables según el método de plaguicidas polares rápidos con un límite de cuantificación de 0,01 mg/kg de suelo, lo cual fue evaluado a 30 días de aplicado el herbicida Octano.
- Las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azotobacter* cultivadas en 27 placas, incubadas a 32 °C, utilizando el medio de cultivo Agar Ashby Manitol, presentaron formas de bacilos y cocos con fluorescencia, se identificaron bioquímicamente como Gram negativas y reaccionaron de manera positiva a diversos azúcares.
- El glifosato, en su formulación comercial de gránulos solubles, según dosis empleadas en el experimento afectó el pH del suelo de manera significativa (KW = 21,409, p-value = 0,0002627), en un proceso temporal de acidificación que va desde 5,23 hasta 3,88.
- El glifosato, en su formulación comercial de gránulos solubles, según dosis empleadas en el experimento afectó a las bacterias *Azotobacter* spp. disminuyendo su población de manera significativa (KW = 23,022, p-value = 0,0001254) y en ningún caso este ingrediente activo estimuló su crecimiento.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar análisis del suelo en diversos periodos posteriores a la aplicación del glifosato para determinar su permanencia y proceso de adsorción según las propiedades fisicoquímicas del suelo.
- Se recomienda a los agricultores guiarse por las buenas prácticas ambientales y según trabajo seguro en el momento de manipular el herbicida y aplicarlo en campo por el riesgo potencial para la salud y la contaminación de otras plantas como cereales dentro de los cultivos de café.
- Estudiar el comportamiento de las bacterias *Azotobacter* spp. frente a otros pesticidas utilizados en la agricultura.
- Realizar investigaciones sobre identificación de diversas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno a nivel molecular.
- Se recomienda en investigaciones posteriores analizar el pH del agua que se usará para utilizar los tratamientos en campo por la influencia de este parámetro en la eficiencia del herbicida.

REFERENCIAS

- Aquilanti, L., Favilli, F., y Clementi, F. (2004). Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1475–1483. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071704001506?via%3Dihub>
- Ansari, M., Hatami, B. y Sedighi-Khvida. S. (2019). Toxicity, biodegradability and detection methods of glyphosate as the most used herbicide: a systematic review. *J Environ Health Sustain Dev*. 4(2): 731-43. Doi. 10.18502/jehsd.v4i2.1053.
- Avigliano, L. (2018). *Efecto del glifosato sobre el crecimiento y reproducción de crustáceos superiores*. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n6353_Avigliano.pdf
- Bailón, R., Florida, R. y Gil, B. (2015). Influencia del glifosato en el proceso de humificación en condiciones de Selva Alta, Tingo María. *Investigación y Amazonía*, 4 (1 y 2): 41-47. <http://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/67>
- Barrero, C. L. (2016). *Microbiología Clínica*. Universidad Europea de Madrid. Editorial Síntesis. Madrid. <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Bórtoli, P. V., Verdenelli, R. A., Conforto, C., Vargas, G. S. y Meriles, J. M. (2012). Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba-Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/21259>
- Caldas, E. D. (2019). Toxicological Aspects of Pesticides. *Sustainable Agrochemistry*, 275–305. Doi:10.1007/978-3-030-17891-8_9
- Calvo, G. S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Universidad de Salamanca. Salamanca-España. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3761553.pdf>
- Camino, M. S. y Aparicio, V. C. (2010). Aspectos ambientales del uso del glifosato. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce-Argentina. <https://inta.gov.ar/documentos/aspectos-ambientales-del-uso-del-glifosato>

- Campuzano, C. C., Feijóo, F. L. M., Manzur, P. K., Palacio, M., M., Rendón, F. J. y Zapata, D. J. P. (2017). Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema. *Rev CES Salud Pública*, vol. 8(1): 121-133. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6176888>
- Candela, R. E. (2016). Comportamiento de atrazina y su relación con la práctica de fertilización nitrogenada en un suelo de la Pedanía Cañas, Departamento Colón, Provincia de Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba-Argentina. <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/4180>
- Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá-Colombia. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>
- Centner, T. J., Russell, L. y Mays, M. (2019). Viewing evidence of harm accompanying uses of glyphosate-based herbicides under US legal requirements. *Science of The Total Environment*, 648, 609–617. Doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.156
- Conde, P. A. (2011). *Efecto del glifosato sobre comunidades microbianas benéficas y patógenas en el suelo de Uruguay*. (Tesis de Maestría). Universidad de la República. Montevideo-Uruguay. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/4130/1/uy24-15385.pdf>
- Duke, S. O. (2017). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027–1034. Doi:10.1002/ps.4652
- Escobar, C., Horna, Y., Carreño, C. y Mendoza, G. (2011). Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersicon esculentum* Mill. Tomate en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. Vol. 2, n° 1, pp. 39-49. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=357633697005>
- Esqueche, B. A. S. y Quispe, S. G. A. (2017). *Caracterización de bacterias del género Azotobacter aisladas de rizoplano y rizósfera de Asparagus officinalis L. y su potencial como promotoras de su crecimiento en las plantas*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque-Perú. <http://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/UNPRG/1123/BC-TES-5903.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Flores, G. A. C., Contreras, E. J. C., Reyes, V. M. H. y Rodríguez, H. R. (2012). Aislamiento e identificación de cepas nativas del suelo mexicano del género *Azotobacter*. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. Vol. 4, n° 8. <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM8/4.pdf>
- Florida, N., López, C. y Pocomucha, V. (2012). Efecto del herbicida paraquat y glifosato en propiedades del suelo que condicionan el desarrollo de bacterias y fungi. *Investigación y Amazonía*; 2 (1-2): 35-43. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo María-Perú. <http://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/view/100>
- García, D. I. E. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los ecosistemas. *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 43, núm. 1, pp. 1-3. Buenos Aires, Argentina. <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213019226001.pdf>
- García, G. D. (2019). *Aislamiento y caracterización de cepas de Azotobacter spp. y el efecto de la sobreexpresión de los sRNA: RsmZ1 y RsmZ6 sobre la producción de alginato*. (Tesis de grado). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. <file:///C:/Users/Lab%20Ciencias%20/Downloads/849919TL.pdf>
- Hagner, M., Mikola, J., Saloniemi, I., Saikkonen, K. y Helander, M. (2019). Effects of a glyphosate-based herbicide on soil animal trophic groups and associated ecosystem functioning in a northern agricultural field. *Scientific Reports*. [Doi.org/10.1038/s41598-019-44988-5](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44988-5)
- Hernández, S. R., Fernández, C. C. y Baptista, L. P. (2014). *Metodología de la investigación*. México, D.F: Mc Graw Hill. Sexta Edición. <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wpcontent/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
- Hernández, G. 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* (Argentina) 36 (2): 105-114. <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/5597>
- Huete, A. Y. R., Torres, D. J. y Dominguez, P. D. (2019). Comportamiento morfológico del maíz inoculado con *Azotobacter chroococcum* a dosis reducida de fertilizante nitrogenado. *Avances*. Vol.21 No. 2, p.166-178. ISSN 1562-3297. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7006742>

- Huhn, C. (2018). More and enhanced glyphosate analysis is needed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(13), 3041–3045. Doi:10.1007/s00216-018-1000-3
- Jaramillo, J. D. F. (2002). *Introducción a las ciencias del suelo*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín-Colombia.
<http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
- Jiménez, A. D. J. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción de DNA ribosomal 16S. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia.
<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8544>
- Jnawail, A. D., Ojha, R. B. y Marahatta, S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A review. *Adv Plants Agric Res* 2(6): 00069. Doi: 10.15406/apar.2015.02.00069
- Jordán, L. A. (2006). *Manual de Edafología*. Universidad de Sevilla.
<http://files.infoagroconstanza.webnode.es/200000017-c2dccc3d62/edafologia%20del%20suelo.pdf>
- Kumar, V., Singh, S. y Upadhyay, N. (2019). Effects of organophosphate pesticides on siderophore producing soils microorganisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101359. Doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101359
- Lara, M. C. L., Villalba, A. M. y Oviedo, Z. L. E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Universidad Nacional de Córdoba.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2512945>
- León y Rojas (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter* spp. aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays* L.). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque-Perú.
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>
- Lista de plaguicidas de uso agrícola registrados con normas andinas, D.S. N° 16-2000-AG y D.S. N° 001-2015-MINAGRI.
<https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1676334/ANEX2.pdf>

- López, C. A., De Bashan, L. A., Bacilio, J. M. y Bashan, Y. (2015). La investigación en microbiología ambiental en Baja California: importancia y usos. *Revista digital de divulgación científica*. Recursos Naturales y Sociedad. Vol. I (7): 83-98. Doi:10.18846/RENAYSOC.2015.01.01.01.0007
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. M. (2003). *Biología de los microorganismos*. (10 edición). Estados Unidos de Norte América, Illinois: Pearson Educación. <https://www.casadellibro.com/libro-brock-biologia-de-los-microorganismos-10-ed/9788420536798/926664>
- Martínez, N. P., Bernal, C. J. y Romero, T.L. (2011). Efectos del glifosato sobre microorganismos diazotróficos y nitrificantes en ecosistemas Alto Andino y Seco Tropical Colombianos. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3788339.pdf>
- Mejía, C. F. R. (2005). *Eficiencia de los Microorganismos Efectivos (EM) y Bokashi en la recuperación de suelos contaminados con glifosato*. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo-Perú. <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5998/Tesis%20Doctorado%20-%20Freddy%20Mej%20c3%ada%20Coico.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ministerio del Ambiente. (2014). Guía para el muestreo de suelos. Dirección General de la calidad ambiental. Lima – Perú. <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2018/07/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELO.pdf>
- Montero, N., Fauvelle, V., Banks, A., Kaserzon, S. y Mueller, J. (2017). Glyphosate herbicide: is it as safe as we thought? *Austral Ecology*, Wiley, In press, ff10.1111/aec.12603ff. ffhal01768833f. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01768833/document>
- Padilla, J. T. y Magdi Selim, H. (2019). Time-dependent sorption and desorption of glyphosate in soils: multi-reaction modeling. *Vadose Zone J.* 18:180214. Doi:10.2136/vzj2018.12.0214
- Paz, M. C. y López, C. A. (2011). *Glifosato, genética, salud y medio ambiente*. Universidad de las Américas. Editorial: Hojas y Signos. Quito-Ecuador. <https://www.academia.edu/20459311>

- Pedemonte, C. F. E. (2017) *Problemática del uso de glifosato*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima-Perú. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3011/T10-P4-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Perea, M. E. y Tupac, O. J. (2016). Efecto del herbicida glifosato en hongos endófitos de raíz y keikis de *Epidendrum melinanthum* (orchidaceae). *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, vol. 16, núm. 2. Universidad de Costa Rica. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44347813009>
- Pérez, M. A., Navarro, H. y Miranda, E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (Número especial sobre plaguicidas) 45-64. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37028958003>
- Piola, L. (2011). *Ensayos ecotoxicológicos para la evaluación del impacto de plaguicidas en suelos agrícolas de Argentina*. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires-Argentina. https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n4887_Piola.pdf
- Ramos, M. M. M. (2016). *Efecto del glifosato sobre las propiedades del suelo de una plantación forestal de Cedrela lilloi C.D.C. Leoncio Prado, Huánuco*. (Tesis de grado) Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo-Perú. <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/3483>
- Ramos, C. E. V., Bonilla, B. y Aguilar, M. (2018). Interacciones entre plantas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal. CITECSA. Barrancabermeja-Colombia. <http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/article/view/162/pdf>
- Ramírez, M. F., Bravo, D. V. y Herrera, L. G. (2017). Uso del herbicida glifosato en Costa Rica en el periodo 2007 a 2015. *Uniciencia*, vol. 31, núm. 1, 2017. Universidad Nacional, Costa Rica. Doi: 10.15359/ru.31-1.7
- Ramírez, B. L. G. y Ugaz, H. J. F. S. (2014). *Bacterias rizosféricas fijadoras de nitrógeno en Oryza sativa L. "arroz", Lambayeque*. (Tesis de grado). Universidad Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque-Perú. <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/8>
- Rivera, A. L. T. (2018). *Efecto de la aplicación del glifosato en la microfauna del suelo de cultivo de café (Coffea arabica) variedad Catimor en San Ignacio- Cajamarca, 2017-2018*. (Tesis de grado). Universidad César Vallejo. Lima-Perú. <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/21140>

- Román, C., Mamani, G. y García, V. (2014). Caracterización molecular de *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp. y *Pseudomonas* sp. promotoras del crecimiento vegetal de cultivos de *Solanum tuberosum* y *Zea mays*. Universidad Nacional del Centro del Perú. <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/1820/1772>
- Salazar, L. N. J. y Aldana, M. M. L. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. Universidad de Sonora. Sonora-México. <https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/article/download/83/76>
- Santric, L., Radivojevic, L., Gajic-Umiljendic, J., Saric-Krsmanovic, M. y Durovic-Pejcev, R. (2018). The effects of nicosulfuron and glyphosate on microbial activity of different soils. *Planta Daninha*; v36: e018159989. Doi.org/10.1590/s0100-83582018360100103
- Shahid, M., Zaidi, A., Ehtram, A. y Khan, M. S. (2019). In vitro investigation to explore the toxicity of different groups of pesticides for an agronomically important rhizosphere isolate *Azotobacter vinelandii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Doi:10.1016/j.pestbp.2019.03.006
- Schweizer, L. S. (2011). Muestreo y análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria. Costa Rica.
- Sidoli, P., Baran, N. y Angulo, J. R. (2015). Glyphosate and AMPA adsorption in soils: laboratory experiments and pedotransfer rules. *Environ Sci Pollut Res* 23:5733–5742. Doi.org/10.1007/s11356-015-5796-5
- Soares, C., Pereira, R., Spormann, S. y Fidalgo, F. (2019). Is soil contamination by a glyphosate commercial formulation truly harmless to non-target plants? – Evaluation of oxidative damage and antioxidant responses in tomato. *Environmental Pollution*. Doi:10.1016/j.envpol.2019.01.063
- Sousa, S., Maia, M. L., Correia-Sá, L., Fernandes, V. C., Delerue-Matos, C., Calhau, C. y Domingues, V. F. (2019). Chemistry and toxicology behind insecticides and herbicides. *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*, 59–109. Doi:10.1007/978-3-030-23396-9_3
- Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M. V., y González-López, J. (2005). Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 270(1), 223–232. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11104-004-1522-7>

- Tévez, H. R. y Dos Santos, A. M. (2015). pH dependence of glyphosate adsorption on soil horizons. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, vol. 67, núm. 3, pp. 509-516. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94348267016>
- Valderrama, A. L. C. (2013). *Evaluación de cepas nativas de Azotobacter spp. como agente reductor de urea en el cultivo de caña de azúcar (Saccharum sp.)*. (Tesis de maestría). Universidad del Valle. Valle del Cauca-Colombia. <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/10176/1/7720-0446202.pdf>
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R. y Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616-617, 255–268. Doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.309
- Vargas, B. P. y Castro, B. L. (2019). Aislamiento y evaluación de microorganismos solubilizadores de fósforo de Andisoles de Costa Rica. Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica. http://www.mag.go.cr/rev_agr/v43n01_047.pdf
- Vera, M. S. (2011). *Impacto del glifosato y algunos de sus formulados comerciales sobre el perifiton de agua dulce*. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n4940_Vera.pdf
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, vol. XX, núm. 39, pp. 169-186. Argentina. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14512426010>
- Zhan, H., Feng, Y., Fan, X. y Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. Guanghou-China. Doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0

TERMINOLOGÍA

Agricultura. Es una actividad realizada de manera convencional o tecnificada que incluye un conjunto de interacciones dinámicas entre factores bióticos y abióticos; por ejemplo, los tipos de suelo, los microorganismos y las plantas (Vargas y Castro, 2019).

Bacteria. Es el conjunto de microorganismos caracterizado por ser el más numeroso y pequeño del suelo, por lo general no suelen fabricar sus propios alimentos (heterótrofos) y su actividad la realizan dentro de la descomposición de la materia orgánica (Jaramillo, 2002).

Colonia. Es un conjunto de bacterias agrupadas en una sola masa de célula, que pertenece a una misma especie, ha crecido a partir de una sola célula y puede observarse a simple vista sobre el medio de cultivo que se ha preparado (Barrero, 2016).

Fijación biológica del nitrógeno (FBN). Mecanismo realizado por algunas bacterias que consiste en la conversión de nitrógeno en amoníaco de manera simbiótica o asimbiótica (Ramírez y Ugaz, 2014).

Herbicidas. Son aquellos productos fitosanitarios, en su mayoría sintéticos, cuya función es combatir las malezas dentro de un campo de cultivo a través de la entrada en las células de las plantas ya sea de forma parcial o total (Nicholls y Altieri, 1997, citado por Vera, 2011).

Medios de cultivo. Son preparados a base de agua y nutrientes con el contenido y condiciones adecuadas para ser asimilado por los microorganismos en su proceso de metabolismo, permitiendo su crecimiento si se cuenta con las condiciones fisicoquímicas adecuadas (Barrero, 2016).

Microorganismos. Es el conjunto de seres vivos con un tamaño menor a 200 μm , que se desarrollan en ecosistemas terrestres y acuáticos distribuidos en todo el planeta (Jaramillo, 2002).

Nitrógeno. Es un elemento químico que se encuentra en la atmósfera terrestre en un 78 %, su estado es gaseoso a temperatura y presión ambiental, siendo en su forma diatómica relativamente inerte (Pacheco Avila *et al.*, 2002, citado por Candela, 2016).

Nitrogenasa. Es la enzima producida por algunas bacterias que reduce el nitrógeno molecular en amoníaco (Jaramillo, 2002).

Rizósfera. Es la zona del suelo más cercana a las raíces de los árboles donde se desarrollan diversos microorganismos implicados en la descomposición de la materia orgánica (Jiménez, 2007).

APÉNDICE

Apéndice 1. Autorización para uso del Laboratorio de ciencias básicas

UCSS  **NUEVA CAJAMARCA**

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Nueva Cajamarca, 8 de julio del 2019

Estimado:
Sr. MARCO AVELLANEDA VÁSQUEZ
Alumno de Ingeniería Ambiental

ASUNTO: AUTORIZACIÓN PARA EL USO DE LABORATORIO

De mi especial consideración.-

Estimado alumno, sirva la presente para comunicarle que tras diálogo con el Jefe de Laboratorio de Ciencias Básicas, Ing. Denis Izquierdo Hernández, se AUTORIZA su pedido de usar las instalaciones de laboratorio para los fines que usted expresa: ejecutar investigación para la obtención de su título profesional.

Le pido también que coordine con el Ing. Izquierdo las condiciones del uso la misma que no debe interrumpir las horas de prácticas de los alumnos.

Sin otro particular, quedo agradecido por su atención.

Atentamente,

 
MARCO ANTONIO ARIAS PALOMINO
Director Administrativo

Apéndice 2. Medio Agar Ashby Manitol

Nombre	Fórmula	Cantidad (g/L)
Manitol	$C_6H_{14}O_6$	20,00
Hidrógeno fosfato dipotásico	K_2HPO_4	0,20
Sulfato de magnesio	$MgSO_4$	0,20
Cloruro de sodio	$NaCl$	0,20
Sulfato de potasio	K_2SO_4	0,10
Carbonato de calcio	$CaCO_3$	5,00
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	15,00
pH (25 °C)		7,4 ±0,2

Fuente: Shahid et al., (2019).

Apéndice 3. Reporte de análisis de suelo sobre rastros de glifosato



Informe N° 391501/768858
File : O/L AGR/AG-230134-01A
 Lima (Perú), 17 de enero, 2020

Pág. 1 de 1

REPORTE DE ANÁLISIS

1.	A solicitud de	:	UNIVERSIDAD CATOLICA SEDES SAPIENTIAE
2.	Análisis a realizar	:	Determinación de residuos de Pesticidas.
3.	Producto identificado como	:	Suelos
	<i>Identificado por el cliente como</i>	:	SUELOS / ANÁLISIS GLIFOSATO - UNIVERSIDAD CATOLICA SEDES SAPIENTIAE
4.	Cantidad de muestra recibida	:	01 Kg. aprox.
5.	Fecha de recepción de la muestra	:	06 de enero, 2020
6.	Características y condiciones De recepción de la muestra	:	Bolsa plástica
7.	Fecha de finalizados los análisis	:	17 de enero, 2020

De acuerdo con el Informe de Ensayo RM°56897, de laboratorio tercero acreditado, los resultados se transcriben a continuación:

Determinación (*)	Unidad	Resultados	LOQ	Método de ensayo
Glyfosato	mg/Kg	No Detectable	0,01	Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in food of vegetable origin through LC-MS/MS that involves simultaneous extraction with methanol (Method QuPPE).

LOQ: Límite de Cuantificación

Los resultados emitidos en el presente Informe de Análisis corresponden a los ensayos solicitados y realizados a la muestra recibida descrita en el ítem 3.



SGS del Perú S.A.C.
Agriculture, Food and Life
 Maria Gracia Verand

Este documento es emitido por la Compañía bajo sus Condiciones Generales de Servicio, que pueden encontrarse en la página <http://www.sgs.pe/ek-ES/Terms-and-Conditions.aspx>.

Ultima Revisión Julio 2015

SGS del Perú S.A.C. | Av. Emor Faucett 3348 - Callao 1 | (51-1) 517 1900 | www.sgs.pe

Miembro del Grupo SGS (Societe Generale de Surveillance)

P19101

N° 616294

Apéndice 4. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo muestra patrón



LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443



RESULTADO DE ANALISIS DE SUELO - CARACTERIZACION

NOMBRE : EFECTO DEL GLYFOSATO SOBRE LA POBLACION DE Azotobacter spp.
PROCEDECENCIA : PRESENTE EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - PROVINCIA
FECHA DE INGRESO : 4-Oct-19

PROFUNDIDAD : 0 - 15 cm
FECHA DE REPORTE : 18-Oct-19
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCION : Marco E. Avellanera Vásquez

Nro	CLAVE LABORATORIO	EDAD DEL CULTIVO	PROCEDECENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico						Análisis Químico												
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica dS / m	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					
				Arena	Arcilla	Limo							N	P	K		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺	Saturación de Al
				%	%	%	%	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo	%											
1	ASC19 - 0608	Café en producción	CC.NN. El Dorado - Moyobamba	42.12	16.48	41.40	Franco	1.44	5.23	0.00098	-	3.100	0.140	22.86	29.27	16.28	12.40	1.86	0.14	0.08	1.80	11.1%
			UTM 18 M 241579 E, 9364518 N																			

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura	: Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	: Walkley y Black	Sodio y Potasio	: Fotometría de Llams
pH	: Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno	: Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio	: Versenato E.D.T.A
Conductividad Eléctrica	: Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fósforo	: Olsen Modificado	Aluminio cambiabile	: Yuan, extracción con KCl 1N
Carbonatos	: Gasovolumétrico con calcímetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico	: Suma de Bases cambiabiles	Acidez Activa	: Yuan, extracción con KCl 1N

VºBº Ing. Carlos Egoivil de la Cruz
C.I.P. N° 32743



Gleoder Ruiz Flores
Laboratorista de Suelos

Apéndice 5. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 1



San Martín

GOBIERNO REGIONAL
(El pueblo está primero)

LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443

RESULTADO DE ANÁLISIS DE SUELO - CARACTERIZACION



NOMBRE : EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA POBLACION DE *Azotobacter spp.* PRESENTE EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - MOYOBAMBA, SAN MARTIN
PROCEDENCIA : Comunidad Nativa "El Dorado" - Moyobamba, San Martín
FECHA DE INGRESO : 28-Feb-20

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm
FECHA DE REPORTE : 1-Jul-20
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCIÓN : MARCO E. AVELLANEDA VASQUEZ

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico					Análisis Químico													
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica dS / m	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					Saturación de Al
				Arena	Arcilla	Limo							N	P	K		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺	
				%	%	%	%	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo						%						
1		TESTIGO	UTM 18M 241579 E, 9364518 N	42.12	16.48	41.40	Franco	1.44	5.23	0.00098	-	3.100	0.140	22.86	29.27	16.28	12.40	1.86	0.14	0.08	1.80	11.1%
1	ASC20 - 0099	T1	UTM 18M 241579 E, 9364518 N	40.04	10.88	49.08	Franco	1.50	5.22	0.00506	-	3.100	0.286	14.00	116.60	12.89	10.00	1.54	0.35	0.30	0.70	5.4%
2		T1		40.80	10.40	48.80	Franco	1.50	5.24	0.00480	-	3.100	0.283	16.30	123.08	12.15	9.60	1.44	0.30	0.31	0.50	4.1%
3		T1		40.90	10.80	48.30	Franco	1.50	5.23	0.00527	-	3.100	0.283	12.80	181.38	11.67	9.20	1.38	0.33	0.46	0.30	2.6%
4		T1		40.30	10.90	48.80	Franco	1.50	5.24	0.00563	-	3.100	0.284	14.9	106.89	11.56	9.20	1.29	0.30	0.27	0.50	4.3%
5		T1		40.20	11.00	48.80	Franco	1.50	5.23	0.00524	-	3.100	0.29	16.80	136.04	13.30	10.80	1.62	0.33	0.35	0.20	1.5%

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura	: Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	: Walkley y Black	Sodio y Potasio	: Fotometría de Llama
pH	: Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno	: Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio	: Versenato E.D.T.A
Conductividad Eléctrica	: Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fósforo	: Olsen Modificado	Aluminio cambiante	: Yuan, extracción con KCl 1N
Carbonatos	: Gasovolumétrico con calcímetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico	: Suma de Bases cambiables	Acidez Activa	: Yuan, extracción con KCl 1N

VºBº Ing. Carlos Egoavil De la Cruz
C.I.P. N° 32743



Gleoder Ruiz Flores
Laboratorista de Suelos

Apéndice 6. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 2



LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA
San Martín
 GOBIERNO REGIONAL
¡El pueblo está primero!

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
 Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443

RESULTADO DE ANÁLISIS DE SUELO - CARACTERIZACIÓN



NOMBRE : EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA POBLACION DE Azotobacter spp. PRESENTE EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - MOYOBAMBA, SAN MARTIN
PROCEDENCIA : Comunidad Nativa "El Dorado" - Moyobamba, San Martín
FECHA DE INGRESO : 28-Feb-20
 2

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm
FECHA DE REPORTE : 1-Jul-20
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCIÓN : MARCO E. AVELLANEDA VASQUEZ

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico					Análisis Químico													
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	Conductividad Eléctrica	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables						
				Arena	Arcilla	Limo						N	P	K		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺	Saturación de Al	
%	%	%	1:1	ds/m	%	%	%	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo	%											
1	ASC20 - 0100	T2	UTM 18M 241613 E, 9364571 N	43.88	10.92	45.20	Franco	1.50	4.63	0.00763	-	3.100	0.284	19.00	131.18	13.52	10.40	1.56	0.32	0.34	0.90	6.7%
2		T2		43.60	10.90	45.50	Franco	1.50	4.93	0.00821	-	3.100	0.287	18.40	87.45	12.90	10.00	1.40	0.28	0.22	1.00	7.8%
3		T2		43.70	10.80	45.50	Franco	1.50	5.00	0.00702	-	3.100	0.285	20.40	72.88	13.29	10.80	1.50	0.30	0.19	0.50	3.8%
4		T2		43.80	10.70	45.50	Franco	1.51	4.50	0.00756	-	3.100	0.283	18.1	59.92	12.03	9.60	1.34	0.34	0.15	0.60	5.0%
5		T2		43.90	11.00	45.10	Franco	1.50	5.95	0.00687	-	3.100	0.283	21.90	69.64	13.36	10.40	1.56	0.22	0.18	1.00	7.5%

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura	Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	Walkley and Black	Sodio y Potasio	Fotometría de Llama
pH	Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno	Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio	Versenato E.D.T.A
Conductividad Eléctrica	Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fosforo	Olsen Modificado	Aluminio cambiabile	Yuan, extracción con KCl 1N
Carbonatos	Gasovolumetrico con calcimetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico	Suma de Bases cambiabiles	Acidez Activa	Yuan, extracción con KCl 1N

VºBº Ing. Carlos Egoávil De la Cruz
 C.I.P. Nº32743



Glendora Liz Flores
 Laboratorista de Suelos

Apéndice 7. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 3



San Martín

GOBIERNO REGIONAL
El pueblo está primero

LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443



RESULTADO DE ANALISIS DE SUELO - CARACTERIZACION

NOMBRE : EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA POBLACION DE Azotobacter spp. PRESENTE
PROCEDENCIA : EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - MOYOBAMBA, SAN MARTIN
FECHA DE INGRESO : Comunidad Nativa "El Dorado" - Moyobamba, San Martín
28-Feb-20

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm
FECHA DE REPORTE : 1-Jul-20
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCION : MARCO E. AVELLANEDA VASQUEZ

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico					Análisis Químico														
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica dS / m	Carbono Orgánico	Materia Orgánica Oxidable	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables						Saturación de Al
				Arena %	Arcilla %	Limo %							N %	P ppm	K ppm		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺		
meq / 100 gr de suelo																							
1	ASC20 - 0101	T3	UTM 18M 241672 E, 9364557 N	41.28	13.04	45.68	Franco	1.47	4.90	0.00976	-	3.100	0.290	17.20	124.70	12.76	9.20	1.38	0.36	0.32	1.50	11.8%	
2		T3		41.00	13.00	46.00	Franco	1.47	4.50	0.00690	-	3.100	0.288	16.80	116.60	13.94	10.00	1.54	0.30	0.30	1.80	12.9%	
3		T3		41.30	12.90	45.80	Franco	1.47	4.80	0.00808	-	3.100	0.288	16.00	90.69	13.25	9.60	1.48	0.34	0.23	1.60	12.1%	
4		T3		41.40	13.04	45.56	Franco	1.47	4.56	0.01018	-	3.100	0.287	14.90	129.56	14.61	11.20	1.68	0.30	0.33	1.10	7.5%	
5		T3		41.50	13.10	45.40	Franco	1.47	4.46	0.00747	-	3.100	0.289	17.10	77.74	13.46	9.60	1.44	0.32	0.20	1.90	14.1%	

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura :	Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica :	Walkley y Black	Sodio y Potasio :	Fotometría de Llama
pH :	Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno :	Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio :	Versenato E.D.T.A
Conductividad Eléctrica :	Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fósforo :	Olsen Modificado	Aluminio cambiante :	Yuan, extracción con KCl 1N
Carbonatos :	Gasovolumétrico con calcímetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico :	Suma de Bases cambiabes	Acidez Activa :	Yuan, extracción con KCl 1N

VIB* Ing. Carlos Egoavil De la Cruz
C.I.P. N° 32743



Gloder Ruiz Flores
Laboratorista de Suelos

Apéndice 8. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 4



San Martín

GOBIERNO REGIONAL
El pueblo está primero

LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443

RESULTADO DE ANALISIS DE SUELO - CARACTERIZACION



NOMBRE : EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA POBLACION DE *Azotobacter* spp. PRESENTE
PROCEDENCIA : EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - MOYOBAMBA, SAN MARTIN
FECHA DE INGRESO : Comunidad Nativa "El Dorado" - Moyobamba, San Martin
28-Feb-20

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm
FECHA DE REPORTE : 1-Jul-20
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCIÓN : MARCO E. AVELLANEDA VASQUEZ

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico					Análisis Químico														
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica dS/m	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables						Saturación de Al
				Arena %	Arcilla %	Limo %							N %	P ppm	K ppm		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺		
1	ASC20 - 0102	T4	UTM 18M 241705 E, 9364607 N	43.44	8.88	47.68	Franco	1.53	4.03	0.00806	-	3.100	0.280	17.00	79.35	12.41	7.60	1.06	0.35	0.20	3.20	25.8%	
2		T4		43.20	9	47.80	Franco	1.53	4.43	0.00976	-	3.100	0.279	18.40	105.26	12.29	8.40	1.26	0.26	0.27	2.10	17.1%	
3		T4		43.30	9.10	47.60	Franco	1.53	4.43	0.01257	-	3.100	0.280	14.20	79.35	14.72	10.80	1.62	0.30	0.20	1.80	12.2%	
4		T4		43.40	8.90	47.70	Franco	1.53	4.43	0.01359	-	3.100	0.279	15.80	72.88	9.93	8.00	1.20	0.34	0.19	0.20	2.0%	
5		T4		43.50	9.20	47.30	Franco	1.53	4.03	0.02200	-	3.100	0.281	16.40	59.92	10.00	6.80	1.02	0.33	0.15	1.70	17.0%	

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura	Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	Walkley y Black	Sodio y Potasio	Fotometría de Llama
pH	Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno	Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio	Versenato E.D.T.A
Conductividad Eléctrica	Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fósforo	Olsen Modificado	Aluminio cambiante	Yuan, extracción con HCl 1N
Carbonatos	Gasovolumétrico con calcímetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico	Suma de Bases Cambiables	Acidez Activa	Yuan, extracción con HCl 1N

V^oB^o Ing. Carlos Egoavil De la Cruz
C.I.P. N° 32743



Gleoder Ruiz Flores
Laboratorista de Suelos

Apéndice 9. Reporte de análisis propiedades físicas y químicas del suelo tratamiento 5



San Martín
GOBIERNO REGIONAL
¡El pueblo está primero!

LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca
Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 556443



RESULTADO DE ANALISIS DE SUELO - CARACTERIZACION

NOMBRE : EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA POBLACION DE *Azotobacter* spp. PRESENTE
PROCEDENCIA : EN EL SUELO CAFETALERO DE EL DORADO - MOYOBAMBA, SAN MARTIN
FECHA DE INGRESO : Comunidad Nativa "El Dorado" - Moyobamba, San Martín
5 28-Feb-20

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm
FECHA DE REPORTE : 1-Jul-20
CULTIVO : Café bajo sombra
ATENCION : MARCO E. AVELLANEDA VASQUEZ

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico					Análisis Químico													
				Textura			Clase Textural	Densidad Apparente	pH	Conductividad Eléctrica	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					
				Arena %	Arcilla %	Limo %							N %	P ppm	K ppm		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺	Saturación de Al %
1	ASC20 - 0103	T5	UTM 18M 241760 E, 9364589 N	45.08	11.12	43.80	Franco	1.50	3.90	0.01476	-	3.100	0.288	18.30	69.64	10.98	7.20	1.08	0.32	0.18	2.20	20.0%
2		T5		45.00	11.00	44.00	Franco	1.50	3.93	0.01373	-	3.100	0.288	16.40	45.34	11.49	7.60	1.17	0.30	0.12	2.30	20.0%
3		T5		44.90	11.20	43.90	Franco	1.50	3.97	0.01693	-	3.100	0.289	18.90	56.68	10.15	6.40	0.96	0.34	0.15	2.30	22.7%
4		T5		45.20	11.30	43.50	Franco	1.50	3.80	0.01267	-	3.100	0.289	18.40	48.58	11.36	7.60	1.14	0.30	0.12	2.20	19.4%
5		T5		45.10	10.90	44.00	Franco	1.51	3.79	0.01399	-	3.100	0.288	16.70	56.68	12.23	8.00	1.23	0.35	0.15	2.50	20.4%

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

Textura	Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	Walkley y Black	Sodio y Potasio	Fotometría de Llama
pH	Potenciómetro en suspensión suelo: agua	Nitrógeno	Micro Kjeldahl	Calcio y Magnesio	Versenato E D T A
Conductividad Eléctrica	Extracto acuoso en la relación suelo: agua 1:1	Fósforo	Olsen Modificado	Aluminio cambiante	Yuan, extracción con KCl 1N
Carbonatos	Gasovolumétrico con calcimetro de Bernard	Capacidad de Intercambio Catiónico	Suma de Bases cambiabiles	Acidez Activa	Yuan, extracción con KCl 1N

VºBº Ing. Carlos Egoavil De la Cruz
C.I.P. N° 32743



Gleoder Ruiz Flores
Laboratorista de Suelos

Apéndice 10. Datos estadísticos realizados con valores del análisis de suelo

Nro	CLAVE LABORATORIO	VALORES	Análisis Físico							Análisis Químico												
			Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Cationico	Elementos Cambiables						Saturación de Al
			Arena	Arcilla	Limo							N	P	K		Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺	K ⁺	Al ⁺⁺⁺		
			%	%	%	%	%	%	%	%	ppm	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo						%		
Testigo	ASC19-0608		42.12	16.48	41.40	Franco	1.44	5.23	0.00098	-	3.100	0.140	22.86	29.27	16.28	12.40	1.86	0.14	0.08	1.80	11.1%	
1	ASC19-0608	PROMEDIO	40.45	10.80	48.76	Franco	1.50	5.23	0.01		3.100	0.28	14.96	132.80	12.32	9.76	1.45	0.32	0.34	0.44	3.6%	
	ASC20-0099	DESV EST *	0.38	0.23	0.28		0.00	0.01	0.00		0.00	0.00	1.64	29.15	0.76	0.67	0.13	0.02	0.07	0.19	0.02	
	ASC20-0101	COE. VAR.	0.94%	2.15%	0.58%		0.25%	0.16%	5.86%		0.00%	0.46%	10.97%	21.95%	6.15%	6.86%	8.94%	6.73%	21.93%	44.30%	0.43%	
2	ASC20-0102	PROMEDIO	43.78	10.86	45.36	Franco	1.50	5.00	0.01		3.10	0.28	19.56	84.21	13.02	10.24	1.47	0.29	0.21	0.80	6.1%	
	ASC20-0103	DESV EST *	0.13	0.12	0.19		0.00	0.57	0.00		0.00	0.00	1.58	28.05	0.60	0.46	0.10	0.05	0.07	0.23	0.02	
	ASC19-0608	COE. VAR.	0.29%	1.07%	0.43%		0.10%	11.37%	7.17%		0.00%	0.59%	8.07%	33.31%	4.57%	4.45%	6.70%	15.77%	33.40%	29.32%	0.28%	
3	ASC20-0099	PROMEDIO	41.30	13.02	45.69	Franco	1.47	4.64	0.01		3.10	0.29	16.40	107.86	13.60	9.92	1.50	0.32	0.28	1.58	11.6%	
	ASC20-0101	DESV EST *	0.19	0.07	0.23		0.00	0.19	0.00		0.00	0.00	0.96	22.54	0.70	0.77	0.11	0.03	0.06	0.31	0.02	
	ASC20-0102	COE. VAR.	0.45%	0.57%	0.50%		0.05%	4.19%	16.89%		0.00%	0.40%	5.86%	20.90%	5.18%	7.76%	7.60%	8.05%	21.02%	19.71%	0.21%	
4	ASC20-0103	PROMEDIO	43.37	9.02	47.62	Franco	1.53	4.27	0.01		3.10	0.28	16.36	79.35	11.87	8.32	1.23	0.32	0.20	1.80	15.2%	
	ASC19-0608	DESV EST *	0.12	0.14	0.19		0.00	0.22	0.01		0.00	0.00	1.55	16.51	1.99	1.51	0.24	0.04	0.04	1.07	0.09	
	ASC20-0099	COE. VAR.	0.27%	1.50%	0.40%		0.14%	5.13%	40.85%		0.00%	0.30%	9.45%	20.81%	16.78%	18.12%	19.33%	11.54%	20.88%	59.71%	0.57%	
5	ASC20-0101	PROMEDIO	45.06	11.10	43.84	Franco	1.50	3.88	0.01		3.10	0.29	17.74	55.38	11.24	7.36	1.12	0.32	0.14	2.30	20.5%	
	ASC20-0102	DESV EST *	0.11	0.16	0.21		0.00	0.08	0.00		0.00	0.00	1.11	9.40	0.76	0.61	0.10	0.02	0.02	0.12	0.01	
	ASC20-0103	COE. VAR.	0.25%	1.43%	0.47%		0.14%	2.06%	11.04%		0.00%	0.19%	6.28%	16.98%	6.77%	8.24%	9.19%	7.08%	17.20%	5.32%	0.06%	

Apéndice 11. Valores de pH en promedio obtenidos por cada tratamiento

Valores de pH					
Repeticiones	Dosis de glifosato (g)				
	1	5	10	15	20
1	5,22	4,63	4,90	4,03	3,90
2	5,24	4,93	4,50	4,43	3,93
3	5,23	5,00	4,80	4,43	3,97
4	5,24	4,50	4,56	4,43	3,80
5	5,23	5,95	4,46	4,03	3,79

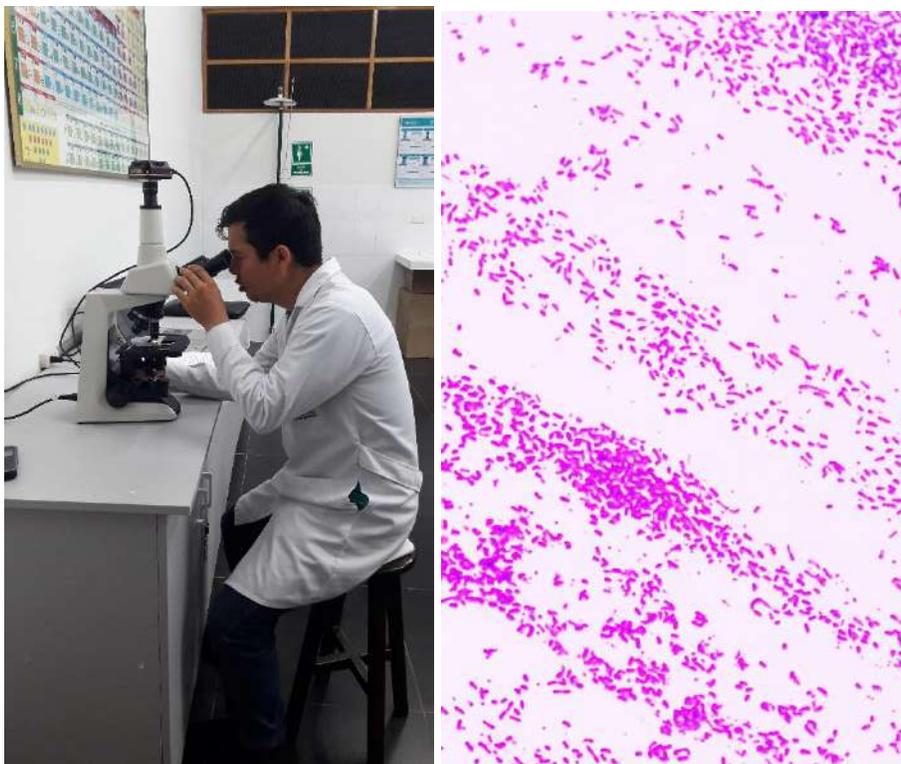
Apéndice 12. Recuento de colonias bacterianas antes de la aplicación del glifosato

Recuento de colonias sin glifosato					
Repeticiones	Dosis de glifosato (g)				
	1	5	10	15	20
1	92	91	80	89	99
2	87	87	80	89	95
3	91	92	104	101	98
4	82	88	89	107	99
5	83	104	87	113	97

Apéndice 13. Recuento de colonias bacterianas después de la aplicación del glifosato

Repeticiones	Dosis de glifosato (g)				
	1	5	10	15	20
	1	65	45	24	13
2	59	37	21	14	3
3	64	53	54	22	3
4	57	47	32	32	3
5	57	57	29	35	1

Apéndice 14. Identificación morfológica a través del microscopio



Apéndice 15. Constancia de depósito de material biológico



FACULTAD DE
INGENIERÍA AGRARIA

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN E IMPUNIDAD"

CONSTANCIA DE DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Por medio de la presente se deja constancia que Sr. Marco Esau Avellaneda Vásquez, tesista con proyecto: "Efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de El Dorado, Moyobamba-San Martín", ha realizado el depósito del siguiente material biológico:

GRUPO BIOLÓGICO	TIPO DE MUESTRA	NOMBRE	CANTIDAD	PROCEDENCIA	CÓDIGO
BACTERIA	CULTIVO EN PLACA	<i>Azotobacter</i>	01	SUELO	CMUCSS-34

El Material biológico fue caracterizado fenotípicamente siguiendo el protocolo descrito por Bergey *et al.* (1989) y se describe a continuación:

Características observadas de la bacteria *Azotobacter* y comparadas con el Manual de Bacteriología de Bergey's

Características	<i>Azotobacter</i>
Células	Bacilos rectos
Diámetro celular (micras)	1.5-2.0
Movilidad	+/-
Coloración de Gram	-
Catalasa	+
Oxidasa	+
Acidificación de:	
Glucosa	+
Sacarosa	+
Fructosa	+
Maltosa	+
Reducción de nitratos	+

Fuente: Bergey, Krieg & Holt (1989)



Las muestras se encuentran resguardadas para el uso exclusivo del proyecto, quedando excluido cualquier uso del material con excepción de la revisión in situ o exposición del mismo.

Los olivos 04 de noviembre de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Armando Chiclla Salazar', is centered on the page.

Armando Chiclla Salazar
Jefe del Laboratorio de Microbiología y
Biotecnología
Facultad de Ingeniería Agraria (FIA) UCSS

Apéndice 16. Pruebas estadísticas para pH

Prueba de normalidad – Shapiro Wilk

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : los datos proceden de una distribución normal.

H_a : los datos no proceden de una distribución normal.

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0.05$$

c. Estadístico de prueba

$$W = \frac{1}{nS^2} \left[\sum_{i=1}^{i=h} a_{j,n} (x_{n-j+1} - x_j) \right]^2$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Shapiro-Wilk normality test

data: pH

W = 0,94327, p-value = 0,1761

f. Conclusión

Dado que el p-value $> 0,05$, se concluye que los datos proceden de una distribución normal

Prueba de homogeneidad u homocedasticidad – Levene

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2$ Las varianzas de pH entre las cinco dosis son iguales.

H_a : $\sigma_i^2 \neq \sigma_j^2$ Las varianzas de pH son diferentes entre al menos una de las cinco dosis.

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0.05$$

c. Estadístico de prueba

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{z}_i - \bar{z}_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (z_{ij} - \bar{z}_{..})^2}$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")		
	Df	F value Pr(>F)
group	4	3,3805 0,02877 *
	20	

Signif. codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

f. Conclusión

Dado que el p-value $<0,05$, se concluye que las varianzas de pH en entre las dosis no son homocedásticas.

Análisis de varianza (ANOVA) –Kruskal Wallis

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : Las medianas de pH en cada una de las cinco dosis de glifosato son iguales

H_a : Al menos una de las medianas de pH es diferente en cada una de las cinco dosis de glifosato

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0.05$$

c. Estadístico de prueba

$$H = \frac{12}{N(N-1)} \sum_{i=1}^k \left(\frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1)$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Kruskal-Wallis rank sum test	
data:	pH by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared =	21,409, df = 4, p-value = 0,0002627

f. Conclusión

Dado que el p-value $<0,05$, se concluye que al menos una mediana de pH es diferente entre las cinco dosis de glifosato

Comparaciones múltiples –Tukey’s range

a. Planteamiento de hipótesis

$H_0: M_{ei} = M_{ej}$ Las medianas de pH son iguales en cada dosis de glifosato

$H_a: M_{ei} \neq M_{ej}$ Las medianas de pH de colonias son diferentes en cada dosis de glifosato

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0,05$$

c. Estadístico de prueba

$$|\bar{R}_u - \bar{R}_v| \geq z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right)}$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Multiple comparison test after Kruskal-Wallis

p.value: 0.05

Comparisons	obs.dif	critical.dif	difference
1 g-5 g	4,1	13,06603	FALSE
1 g-10 g	7,9	13,06603	FALSE
1 g-15 g	14,0	13,06603	TRUE
1 g-20 g	19,0	13,06603	TRUE
5 g-10 g	3,8	13,06603	FALSE
5 g-15 g	9,9	13,06603	FALSE
5 g-20 g	14,9	13,06603	TRUE
10 g-15 g	6,1	13,06603	FALSE
10 g-20 g	11,1	13,06603	FALSE
15 g-20 g	5,0	13,06603	FALSE

f. Conclusión

Existe diferencia significativa entre las dosis 1 g – 15 g, 1 g – 20 g, 5 g – 20 g de glifosato

Apéndice 17. Pruebas estadísticas para muertes de colonias

Prueba de normalidad – Shapiro Wilk

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : los datos proceden de una distribución normal

H_a : los datos no proceden de una distribución normal.

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0,05$$

c. Estadístico de prueba

$$W = \frac{1}{nS^2} \left[\sum_{i=1}^{i=h} a_{j,n} (x_{n-j+1} - x_j) \right]^2$$

d. Regla de decisión

Si p-value. > α no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Shapiro-Wilk normality test

data: Muertes

W = 0,91973, p-value = 0,04598

f. Conclusión

Dado que el p-value > 0,05, se concluye que los datos proceden de una distribución normal

Prueba de homocedasticidad – Levene

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma_3^2 = \sigma_4^2 = \sigma_5^2$ Las varianzas de muertes de colonias entre las cinco dosis son iguales.

H_a : $\sigma_i^2 \neq \sigma_j^2$ Las varianzas de muertes de colonias son diferentes entre al menos una de las cinco dosis.

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0,05$$

c. Estadístico de prueba

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k n_i (\bar{z}_i - \bar{z}_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (z_{ij} - \bar{z}_{..})^2}$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")		
	Df	F value Pr(>F)
group	4	3,0574 0,0406 *
	20	

Nota: Signif. codes: 0 '***' 0,001 '**' 0,01 '*' 0,05 '.' 0,1 '.' 1

f. Conclusión

Dado que el p-value $<0,05$, se concluye que las varianzas de pH en entre las dosis no son homocedásticas.

Análisis de varianza (ANOVA) –Kruskal Wallis

a. Planteamiento de hipótesis

H_0 : Las medianas de muertes de colonias en cada una de las cinco dosis de glifosato son iguales

H_a : Al menos una de las medianas de muertes de colonias es diferente en cada una de las cinco dosis de glifosato

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0,05$$

c. Estadístico de prueba

$$H = \frac{12}{N(N-1)} \sum_{i=1}^k \left(\frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1)$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Kruskal-Wallis rank sum test
data: Muertes by Tratamiento
Kruskal-Wallis chi-squared = 23,022, df = 4, p-value = 0,0001254

f. Conclusión

Dado que el p-value $<0,05$, se concluye que al menos una mediana es diferente entre las cinco dosis de glifosato

Comparaciones múltiples –Tukey’s range

a. Planteamiento de hipótesis

$H_0: M_{ei} = M_{ej}$ Las medianas de muertes de colonias son iguales en cada dosis de glifosato

$H_a: M_{ei} \neq M_{ej}$ Las medianas de muertes de colonias son diferentes en cada dosis de glifosato

b. Nivel de significancia

$$\alpha = 0.05$$

c. Estadístico de prueba

$$|\bar{R}_u - \bar{R}_v| \geq z_{\alpha/k(k-1)} \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right)}$$

d. Regla de decisión

Si p-value. $> \alpha$ no se rechaza la hipótesis nula (H_0)

e. Cálculos y decisión

Multiple comparison test after Kruskal-Wallis

p.value: 0,05

Comparisons	obs.dif	critical.dif	difference
1 g-5 g	5,1	13,06603	FALSE
1 g-10 g	9,9	13,06603	FALSE
1 g-15 g	15,0	13,06603	TRUE
1 g-20 g	20,0	13,06603	TRUE
5 g-10 g	4,8	13,06603	FALSE
5 g-15 g	9,9	13,06603	FALSE
5 g-20 g	14,9	13,06603	TRUE
10 g-15 g	5,1	13,06603	FALSE
10 g-20 g	10,1	13,06603	FALSE
15 g-20 g	5,0	13,06603	FALSE

f. Conclusión

Existe diferencia significativa entre las dosis 1 g – 15 g, 1 g – 20 g, 5 g – 20 g de glifosato

Octano

PLAGUICIDA QUÍMICO DE USO AGRÍCOLA

HERBICIDA AGRÍCOLA

GRÁNULOS SOLUBLES - SG

Composición:

Glyphosate, en forma de sal de amonio 880 g/kg
Aditivos csp 1 kg

Reg. PQUA N° 1733 - SENASA

Titular del registro: **MONTANA S.A.**

Importado y Distribuido por:
MONTANA S.A.

Av. Javier Prado Este N° 6210,
Ofi. 401, La Molina, Lima - Perú
Teléfono: (511) 419 3000
E-mail: info@corpmontana.com

FORMULADO POR:
ZHEJIANG XINAN CHEMICAL
INDUSTRIAL GROUP CO., LTD.
Xinanjiang, Jiande, Zhejiang, China

Contenido Neto: 1kg

Lote N°:
Fecha de Form.:
Fecha de Venc.:



NO CORROSIVO NO INFLAMABLE NO EXPLOSIVO

**LIGERAMENTE PELIGROSO
CUIDADO**

Octano

HERBICIDA AGRÍCOLA

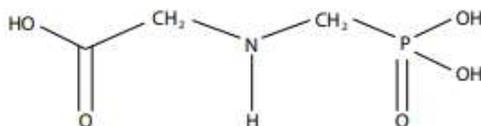
Reg. PQUA N° 1733 - SENASA

I. DATOS DE LA EMPRESA

Empresa Comercializadora: MONTANA S.A.
Empresa Formuladora: OASIS AGROSCIENCE LIMITED
Titular de Registro: MONTANA S.A.
Número de Registro: PQUA 1733 - SENASA

II. IDENTIDAD

Composición: Glifosato
Concentración: 880 g/kg
Formulación: Gránulos Solubles (SG)
Grupo Químico: Fosfonoglicidina
Clase de Uso: Herbicida Agrícola
Fórmula Empírica: C₃H₈NO₃P
Peso Molecular (g mol⁻¹): 169.1
Fórmula Estructural:



III. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL INGREDIENTE ACTIVO GLIFOSATO

Solubilidad en Agua a 25°C:
 15700 mg L⁻¹ a pH 7
 11500 mg L⁻¹ a pH 2.5
 La determinación en medio alcalino no es posible debido a la formación de precipitados
Solubilidad en Solventes Orgánicos a 20°C (mg L⁻¹):
 Acetona: 0.6
 Xileno: 0.6
 Metanol: 10.0
Acetato de etilo: 0.6
Punto de Fusión: 189.5°C
Punto de Ebullición: Se descompone antes de la ebullición (100°C)
Presión de Vapor:
 0.70 x 10⁻⁶ Pa a 20°C
 1.31 x 10⁻⁵ Pa a 25°C

Constante de Henry:

1.12 x 10⁻¹² Pa x m³ x mol⁻¹ a 20°C
 2.1 x 10⁻⁷ Pa x m³ x mol⁻¹ a 25°C

Coefficiente de Partición n- octanol/agua en pH 7 a 20°C:

-3.39 a pH 1.77
 -4.38 a pH 4.61
 -4.85 a pH 6.86
 -4.14 a pH 9.00

No tiene potencial de bioacumulación

DEL PRODUCTO FORMULADO

Estado Físico: Sólido (gránulos)
Color: Ligeramente amarillo
Olor: Sin olor

Densidad aparente = 0.4 - 0.6 g/mL

pH (solución 1%): 3.0 - 8.0

Persistencia a la espuma: ≤ 40 ml después de 1 minuto

Tamaño partícula: 1.0-1.5 mm

Estabilidad en Almacenamiento: El producto es estable por 2 años bajo condiciones normales de almacenamiento en su envase original

Inflamabilidad: No inflamable

Explosividad: No explosivo

Corrosividad: No corrosivo

IV. PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Mecanismo de acción

El glifosato, ingrediente activo de **OCTANO**, produce la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintetasa (EPSP) en el ciclo metabólico del ácido shikímico y bloquea la producción de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano lo que conlleva a la muerte de la planta debido a la incapacidad de producir proteínas.

Modo de acción

OCTANO es un herbicida no selectivo que se absorbe tanto a través de hojas y brotes. Presenta un movimiento acropétalo (ascendente) y basipétalo (descendente) dentro de la planta, lo que conlleva a que pueda alcanzar órganos subterráneos como rizomas o tubérculos. La translocación del glifosato ocurre hacia las zonas de mayor actividad como los meristemas. Las malezas tratadas muestran clorosis entre los 2 y 3 días de realizada la aplicación del producto, sin embargo, la muerte de la planta ocurre entre los 10 y 21 días después de la aplicación.



Av. Javier Prado Este 6210 Oficina 401 La Molina, Lima - Perú
 Telf: (511) 419-3000 / e-mail: info@corpmontana.com
 www.corpmontana.com

V. TOXICIDAD

Toxicidad: Moderadamente peligroso
DL⁵⁰ oral aguda (ratas): >5000 mg/kg de peso corporal. Ligeramente tóxico
DL⁵⁰ dermal aguda (ratas): >5000 mg/kg de peso corporal. Ligeramente tóxico
CL⁵⁰(4h) inhalatoria (ratas): >5.0 mg/L de aire. Ligeramente tóxico
Irritación dermal (conejos): No irritante
Irritación ocular (conejos): Moderadamente irritante
Sensibilización cutánea (conejos de india): No sensibilizante.

VI. ECOTOXICIDAD E IMPACTO AMBIENTAL DEL INGREDIENTE ACTIVO GLIFOSATO

Grupo	Especie	Parámetro	Valor
Aves	Codorniz	DL ₅₀	>5851 mg/kg
Peces	Lepomis macrochirus	CL ₅₀	45 ppm
	Oncorhynchus mykiss	CL ₅₀	134 ppm
Invertebrados acuáticos	Daphnia magna	CL ₅₀	134.3 ppm
	Skeletonema costatum	EC ₅₀	12 mg/L
	Artemia salina	EC ₅₀	15 ppm
	Selenastrium capricornutum	EC ₅₀	14 ppm
Invertebrados terrestres	Abajo	DL ₅₀ (48 h, contacto y oral)	>100 µg/abaja
	Lombriz de tierra	EC ₅₀	>473 mg/kg

Comportamiento en suelo, agua y aire
 La degradación del glifosato ocurre bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, y la vida media en el suelo varía considerablemente, desde unos pocos días a meses o años. La tasa de degradación del glifosato está correlacionada positivamente con la actividad microbiana del suelo, mientras que el pH, o el porcentaje de materia orgánica tiene poca influencia. Glifosato presenta muy baja movilidad en el suelo y no es volátil. En el suelo, la tasa de degradación del glifosato se reduce con la adición de metales catiónicos debido a que se unen fuertemente como por ejemplo: Fe³⁺ o Al³⁺, mientras que la adición de fostato, que compete con el glifosato por los sitios de unión, estimula la degradación.

VII. RECOMENDACIONES DE USO

CULTIVOS	PLAGA		DOSIS Kg/200L	PC (Días)	LMR (ppm)
	Nombre Común	Nombre Científico			
Mandarina	"Pepa Pepa"	Sesuvia verticillata	0.80 - 1.0	1	0.5
	"Capulí cimarrón"	Nicanazo phytolobus			
	"Charrica"	Datura stramonium			
	"Coquito"	Cyperus rotundus			
	"Grama china"	Sorghum halepense			
	"Hierba de galinazo"	Chenopodium murale			
	"Tuyo"	Amaranthus hybridus			
Espinazo	"Verdolaga"	Portulaca oleraceo	0.8 - 1.0	5	0.1
	"Capulí cimarrón"	Nicanazo phytolobus			
	"Charrica"	Datura stramonium			
	"Coquito"	Cyperus rotundus			
	"Grama china"	Sorghum halepense			
	"Verdolaga"	Portulaca oleraceo			
	"Tuyo"	Amaranthus spinosus			
Palo	"Amor seco"	Bidens pilosa	0.8 - 1.0	1	0.2
	"Capulí cimarrón"	Nicanazo phytolobus			
	"Hierba del galinazo"	Chenopodium murale			
	"Verdolaga"	Portulaca oleraceo			
Vid	"Amor seco"	Bidens pilosa	0.8 - 1.0	14	0.5
	"Capulí cimarrón"	Nicanazo phytolobus			
	"Hierba del galinazo"	Chenopodium murale			
	"Lachera"	Euphorbia hirta			
	"Pepa pepa"	Sesuvia verticillata			

PC: Periodo de carencia
 LMR: Límite Máximo de Residuo

VIII. CONDICIONES DE APLICACIÓN

Realizar la aplicación dirigida al follaje de las malezas en activo crecimiento, que posean al menos de 2 a 5 hojas verdaderas. Asegurar un buen cubrimiento de las malezas presentes, de acuerdo a las dosis establecidas. Repetir la aplicación en caso de presentarse una reinfestación de malezas en el campo. Es recomendable que el suelo se encuentre con una adecuada humedad (capacidad de campo) al momento de la aplicación.

IX. COMPATIBILIDAD

OCTANO es compatible con otros herbicidas de uso común, excepto con aquellos de marcada reacción alcalina. Antes de efectuar una mezcla se recomienda hacer pruebas de compatibilidad con el producto que se desee mezclar.

X. REINGRESO A UN ÁREA TRATADA

No ingresar a las áreas tratadas sin ropa de protección adecuada, durante las primeras 12 horas después de la aplicación.

XI. FITOTOXICIDAD

OCTANO es fitotóxico a cualquier planta, por lo tanto, debe evitarse el contacto directo con plantas cultivadas.



Av. Javier Prado Este 6210 Oficina 401 La Molina. Lima - Perú
 Telf: (511) 419-3000 / e-mail: info@corpmontana.com
 www.corpmontana.com

Apéndice 20. Incubadora



Apéndice 21. Equipo cuenta colonias



Apéndice 22. Equipo multiparámetro

