

**UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA**



Efecto del Carbofuran sobre la población de *Azotobacter* spp. en  
suelo cafetalero del caserío La Primavera, provincia de  
Moyobamba-San Martín

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AMBIENTAL

**AUTORES**

Alex Jordany Díaz Fonseca

María Anaí García Herrera

**ASESOR**

Denis Izquierdo Hernández

Rioja, Perú

2022

**METADATOS COMPLEMENTARIOS****Datos de los Autores****Autor 1**

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

**Autor 2**

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

**Autor 3**

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

**Autor 4**

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

**Datos de los Asesores****Asesor 1**

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

**Asesor 2**

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

### Datos del Jurado

#### Presidente del jurado

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

#### Segundo miembro

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

#### 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	
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 tesauro).**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 025 - 2022/UCSS/FIA/DI

Siendo las 10:00 a. m. del día 10 de setiembre de 2022 - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- |                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| 1. Eskim Santiago Valverde Obregón | presidente      |
| 2. Elvira Teófila Castañeda Chirre | primer Miembro  |
| 3. Natividad Lourdes Artica Cosme  | segundo Miembro |
| 4. Denis Izquierdo Hernández       | asesor          |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada **Efecto del Carbofuran sobre la población de *Azotobacter* spp. en suelo cafetalero del caserío La Primavera, provincia de Moyobamba-San Martín** que presentan los bachilleres en Ciencias Ambientales, **Alex Jordany Díaz Fonseca y María Anaí García Herrera**, 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           ...X...

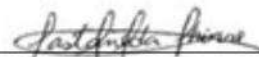
DESAPROBAR       .....

La tesis, con el calificativo de **MUY 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, 10 de setiembre de 2022.



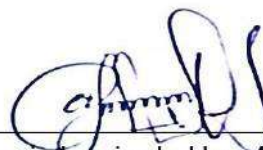
Eskim Santiago Valverde Obregón  
PRESIDENTE



Elvira Teófila Castañeda Chirre  
1° MIEMBRO



Natividad Lourdes Artica Cosme  
2° MIEMBRO



Denis Izquierdo Hernández  
ASESOR

## **DEDICATORIA**

A nuestros padres, por el apoyo económico y soporte emocional que nos brindaron durante nuestra formación universitaria.

A los docentes de la UCSS Filial Rioja: Nueva Cajamarca por compartir sus conocimientos para alcanzar el éxito; por prepararnos para la vida y contribuir con el desarrollo sostenible del país.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Católica Sedes Sapientiae Filial Rioja: Nueva Cajamarca, por acogernos cinco años en sus aulas; a todos los docentes que contribuyeron en nuestra formación integral impartiendo principios, valores y vocación de servicio para ejercer la carrera de Ingeniero Ambiental.

Al Programa Nacional de Beca y Crédito Educativo (PRONABEC), por concederme una beca de estudio y permitir forjar una carrera profesional. María Anaí García Herrera

Al Ing. Denis Izquierdo Hernández, por confiar en nosotros y ayudarnos a alcanzar nuestra meta.

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE APÉNDICES.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.1.1. Internacional.....	4
1.2. Bases teóricas especializadas.....	13
1.2.1. Los insecticidas en la agricultura.....	13
1.2.2. Importancia de los microorganismos en la fertilidad del suelo.....	17
1.2.3. Población microbiana del suelo.....	17
1.2.4. Bacterias fijadoras del nitrógeno.....	17
1.2.5. Medio de cultivo.....	19
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1. Diseño de investigación.....	21
2.1.1. Tipo de investigación.....	21
2.1.2. Lugar y fecha.....	21
2.1.3. Descripción del experimento.....	25
2.1.4. Tratamientos.....	37
2.1.5. Unidades experimentales.....	37
2.1.6. Identificación de las variables y su mensuración.....	38
2.1.7. Diseño estadístico del experimento.....	38
2.1.8. Análisis estadístico de datos.....	39
2.2. Materiales.....	39
2.2.1. Medio de cultivo y material biológico.....	39
2.2.2. Reactivos.....	39

2.2.3. Equipos de laboratorio.....	39
2.2.4. Equipos de protección .....	40
CAPÍTULO III: RESULTADOS .....	41
3.1. Caracterización físico - química del suelo.....	41
3.2. Evaluación del comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran en condiciones de laboratorio .....	42
3.3. Comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran aplicado al suelo en tres periodos en condiciones de campo .....	48
3.4. Evaluación comparativa del comportamiento de <i>Azotobacter</i> spp. en condiciones de laboratorio y campo .....	56
CAPÍTULO IV: DISCUSIONES .....	62
4.1. Caracterización físico - química del suelo.....	62
4.2. Evaluación del comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. en condiciones de laboratorio.....	63
4.3. Evaluación del comportamiento poblacional de <i>Azotobacter</i> spp. en condiciones de campo.....	64
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES .....	65
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES .....	67
REFERENCIAS .....	68
TERMINOLOGÍA.....	74
APÉNDICES .....	76



## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Puntos de muestreo de la finca “El Huascarán” - Primavera del Alto Mayo</i> .....	22
Tabla 2. <i>Dosis establecidas para cada Tratamiento</i> .....	30
Tabla 3. <i>Ubicación de los tratamientos</i> .....	34
Tabla 4. <i>Tratamientos experimentales y sus respectivas dosis</i> .....	37
Tabla 5. <i>Distribución de tratamientos para muestras de invernadero y campo</i> .....	38
Tabla 6. <i>VARIABLES DE INVESTIGACIÓN Y MENSURACIÓN</i> .....	38
Tabla 7. <i>Resultado del análisis físico-químico del suelo</i> .....	41
Tabla 8. <i>Datos de pH de las muestras de suelo con Carbofuran – fase de laboratorio</i> .....	42
Tabla 9. <i>Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 1</i> .....	43
Tabla 10. <i>Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 15</i> .....	43
Tabla 11. <i>Análisis de varianza aditivo para la muerte de colonias</i> .....	45
Tabla 12. <i>Análisis de varianza multiplicativo para la muerte de colonias</i> .....	46
Tabla 13. <i>Comparaciones del ANOVA aditivo sobre a muerte de colonias</i> .....	46
Tabla 14. <i>Prueba de homogeneidad de varianzas sobre la muerte de colonias por tratamiento</i> .....	48
Tabla 15. <i>Datos de pH de las muestras de suelo con carbofuran – fase de campo</i> .....	49
Tabla 16. <i>Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 1</i> .....	49
Tabla 17. <i>Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 15</i> .....	50
Tabla 18. <i>Análisis de varianza aditivo para la muere de colonias</i> .....	53
Tabla 19. <i>Análisis de varianza multiplicativo para muerte de colonias</i> .....	53
Tabla 20. <i>comparaciones múltiples por tratamiento sobre la muerte de colonias</i> .....	54
Tabla 21. <i>Homogeneidad de varianzas sobre la muerte de colonias según tratamiento</i> ....	56
Tabla 22. <i>Análisis de varianza aditivo para el pH como efecto del Carbofuran en campo y laboratorio</i> .....	58
Tabla 23. <i>Análisis de varianza multiplicativo para el pH como efecto del Carbofuran en campo y laboratorio</i> .....	59
Tabla 24. <i>Comparaciones del ANOVA aditivo sobre el pH</i> .....	60
Tabla 25. <i>Homogeneidad de varianzas sobre pH según tratamiento en campo y laboratorio</i> .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Estructura química del Carbofuran.....	15
<i>Figura 2.</i> Destino ambiental del Carbofuran.....	16
<i>Figura 3.</i> (A) Colonias de <i>Azotobacter spp.</i> en medio Ashby. (B) Morfología celular de <i>Azotobacter spp.</i> .....	18
<i>Figura 4.</i> Mapa de ubicación del área de estudio en el sistema de información geográfica.....	23
<i>Figura 5.</i> Mapa de ubicación de los puntos de muestreo. ....	24
<i>Figura 6.</i> Excavación de calicatas donde se tomaron muestras de suelo. ....	25
<i>Figura 7.</i> Preparación de agar Ashby. ....	27
<i>Figura 8.</i> Crecimiento de <i>Azotobacter spp.</i> en agar Ashby manitol. ....	28
<i>Figura 9.</i> Observación en microscopio de la bacteria <i>Azotobacter spp.</i> .....	28
<i>Figura 10.</i> Muestras de suelo esterilizadas. ....	29
<i>Figura 11.</i> Preparación de las dosis de Carbofuran.....	30
<i>Figura 12.</i> Aplicación de gránulos de suelo con Carbofuran.....	31
<i>Figura 13.</i> Efecto del Carbofuran sobre las bacterias <i>Azotobacter spp.</i> .....	31
<i>Figura 14.</i> Identificación y limpieza de las plantas de café .....	32
<i>Figura 15.</i> Aplicación de las dosis de Carbofuran.....	33
<i>Figura 16.</i> Aplicación de gránulos de suelo.....	34
<i>Figura 17.</i> Conteo de colonias. ....	35
<i>Figura 18.</i> Efecto del Carbofuran después de los siete días de evaluación.....	35
<i>Figura 19.</i> Preparación del suelo con agua destilada en proporción 1/1 p/v.....	36
<i>Figura 20.</i> Medición de pH. ....	36
<i>Figura 21.</i> Promedio de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento – fase laboratorio.....	44
<i>Figura 22.</i> Box plot de la dispersión de colonias muertas por periodo según tratamiento – fase laboratorio.....	44
<i>Figura 23.</i> Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos (dosis) a base de Carbofuran sobre las muertes de colonias en laboratorio. ....	47
<i>Figura 24.</i> Representación gráfica de cuantiles teóricos frente a los residuos del modelo ANOVA aditivo en laboratorio.....	47

<i>Figura 25.</i> Promedio de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento – fase de campo.....	51
<i>Figura 26.</i> Box plot de la dispersión de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento..	52
<i>Figura 27.</i> Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos a base de Carbofuran sobre la muerte de colonias – fase de campo.....	54
<i>Figura 28.</i> Cuartiles teóricos frente a los residuos del ANOVA aditivo – fase de campo..	55
<i>Figura 29.</i> Promedio de colonias muertas por fase (campo y laboratorio) según tratamiento. ....	57
<i>Figura 30.</i> Box plot de la dispersión de colonias muertas por fase (campo y laboratorio) según tratamiento. ....	58
<i>Figura 31.</i> Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos sobre la muerte de colonias bacterianas en campo y laboratorio.....	60
<i>Figura 32.</i> Cuartiles teóricos frente a los residuos del modelo ANOVA aditivo en campo y laboratorio..	61

## ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Autorización del uso del terreno para la ejecución del proyecto .....	76
Apéndice 2. Ficha técnica del insecticida Farmadan 480 g/L .....	77
Apéndice 3. Reporte del análisis físico-químico del suelo .....	79
Apéndice 4. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-01 .....	80
Apéndice 5. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-02.....	81
Apéndice 6. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-03.....	82
Apéndice 7. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-04.....	83
Apéndice 8. Protocolo según Villaseñor (2016).....	84
Apéndice 9. Protocolo establecido por Jiménez (2007), para medir el pH. ....	84
Apéndice 10. Cadena de custodia para muestreo de suelos por MINAM (2014). ....	85

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del Carbofuran sobre la población de *Azotobacter* spp. en suelo cafetalero del caserío La Primavera, Provincia de Moyobamba, región San Martín. Se realizaron bioensayos de toxicidad utilizando cepas bacterianas de *Azotobacter* spp. bajo condiciones de invernadero y de campo, donde se definieron tres tratamientos con diferentes dosis de Carbofuran (T1= 0,4, T2= 0,8 y T3= 1,2 ml/200 ml de agua destilada), con 3 repeticiones cada una, más 3 muestras control. Para determinar la muerte de las bacterias se utilizaron 24 placas Petri (12 para la fase de laboratorio y 12 para campo) con agar Ashby-Manitol, a los que se añadieron gránulos de suelo contaminado con Carbofuran, recogidos en el día 1 y 15 después de la aplicación de la sustancia; posteriormente, fueron incubados durante 7 días y se realizaron las evaluaciones de muerte mediante la observación y conteo. Los resultados de la evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. en condiciones de laboratorio determinaron que, según el día y el incremento de las dosis por tratamiento, el efecto era mayor en el tratamiento T3-2, en el que se observó 76 colonias muertas en el día 1 y en el tratamiento T2-3 se observó 517 colonias muertas a los 15 días de haber aplicado el insecticida, siendo estos los dos mayores números de mortalidad bacteriana alcanzados en los bioensayos, con un 40 y 34 %. Los resultados obtenidos de la evaluación en condiciones de campo determinaron que según el incremento de las dosis de Carbofuran, los efectos sobre *Azotobacter* spp. era mayor en las evaluaciones del día 1 y 15. En el tratamiento T2-2 hubo mayor incremento de muertes, con 105 colonias en el día 1; mientras que la repetición T3-1 mostro un mayor efecto con 190 colonias muertas a los 15 días. Se concluye que el insecticida Carbofuran presento efectos significativos en la reducción poblacional de bacterias *Azotobacter* spp. en las dos fases (Campo y laboratorio).

**Palabras claves:** Efecto del Carbofuran, bioensayos, *Azotobacter* spp, dosis, efecto.

## ABSTRACT

The objective of this research was to determine the effect of Carbofuran on the population of *Azotobacter* spp. in coffee soil of the La Primavera village, Moyobamba Province, San Martín region. Toxicity bioassays were carried out using bacterial strains of *Azotobacter* spp under greenhouse and field conditions, where three treatments with different doses of Carbofuran were defined (T1= 0,4, T2= 0,8 and T3= 1,2 ml/200 ml of distilled water), with 3 repetitions each, plus 3 control samples. To determine the death of the bacteria, 24 Petri dishes were used (12 for the laboratory phase and 12 for the field) with Ashby-Mannitol agar, to which granules of soil contaminated with Carbofuran were added, collected on day 1 and 15 after of the application of the substance; subsequently, they were incubated for 7 days and death evaluations were performed through observation and counting. The results of the evaluation of the population behavior *Azotobacter* spp. under laboratory conditions, they determined that, depending on the day and the increase in doses per treatment, the effect was greater; in treatment T3-2, 76 dead colonies were observed on day 1 and in treatment T2-3, 517 dead colonies were observed 15 days after applying the insecticide, these being the two highest numbers of bacterial mortality reached in the bioassays, with 40 and 34 %. The results obtained from the evaluation under field conditions determined that depending on the increase in Carbofuran doses, the effects on *Azotobacter* spp. it was greater in the evaluations of day 1 and 15. In treatment T2-2 there was a greater increase in deaths, with 105 colonies on day 1; while the T3-1 repetition showed a greater effect with 190 dead colonies at 15 days. It is concluded that the insecticide Carbofuran presented significant effects in the population reduction of *Azotobacter* spp. in the two phases (Field and laboratory).

**Keywords:** Effect of Carbofuran, bioassays, *Azotobacter* spp, dose, effect.

## INTRODUCCIÓN

Con el transcurrir de los años y debido al cambio climático la agricultura ha sido afectada por un sinnúmero de plagas y enfermedades, donde el hombre se ha visto obligado a hacer uso indiscriminado de pesticidas para controlar las mismas (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO], 2014). Además, la FAO menciona que el uso de insecticidas se ha convertido en una problemática muy grande debido al uso irracional, por tal motivo estableció códigos de distribución y uso adecuado para evitar daños a los ecosistemas.

Durante los últimos 30 años los insecticidas son utilizados como controladores de diferentes plagas dentro de la agricultura; sin embargo, no se está haciendo un uso adecuado de estas sustancias al momento de ser aplicados en los campos agrícolas; motivo por el cual, es necesario obtener información sobre los daños que ocasionan estos xenobióticos a los ecosistemas y con ello fortalecer los conocimientos a nivel local, regional y nacional sobre el uso indiscriminado de los insecticidas que traen como consecuencia la pérdida de la microfauna existente en los suelos cafetaleros del Alto Mayo y de esta manera evitar el deterioro ambiental, la bioacumulación y la resiliencia de las plagas (Ruiz, 2015). Es por ello, que en la presente investigación se determinó el efecto causado por el activo Carbofuran sobre la bacteria *Azotobacter* spp.

La aplicación constante y continua de estas sustancias químicas (insecticidas) en el desarrollo agrícola han generado residuos que con el tiempo se han ido acumulando en el suelo, ocasionando consecuencias como la compactación, salinización del suelo, disminución de la actividad microbiana y problemas en el drenaje, siendo principalmente afectados la diversidad de microorganismos como las de género *Azotobacter* quienes contribuyen al incremento de la fertilidad del suelo como parte de su metabolismo, son promotoras del desarrollo de las plantas, fijan el nitrógeno, producen antibióticos, hormonas y otros compuestos que son de vital importancia para el crecimiento de los cultivos y equilibrio en el suelo (Escobar *et al.*, 2011). Es por ello, que muchos se han preocupado y han realizado estudios para evaluar y dar a conocer cuáles son los efectos de los pesticidas

entre ellos el Carbofuran, sobre la biota del entorno agrícola, entre ellos Avellaneda (2022), quien realizó la evaluación del efecto del herbicida Glifosato sobre la bacteria *Azotobacter* spp. las cual fue desarrolladas en laboratorio, donde concluye que el glifosato causa daños sobre las bacterias disminuyendo su población e inhibiendo su crecimiento.

En los últimos 10 años, el valle del Alto Mayo se vio afectado por el uso inadecuado de agroquímicos, entre ellos el insecticida Carbofuran, el cual es utilizado para el control de plagas (insectos) que atacan la planta y el fruto de los diferentes cultivos como el café, plátano, maíz, etc. Asimismo, los residuos generados por la aplicación de este insecticida van a parar en los riachuelos y ríos cercanos al campo de aplicación por factores como la infiltración y escorrentía, provocando daños al ecosistema acuático. La aplicación del Carbofuran ha generado consecuencias ambientales muy graves a diferentes factores del ecosistema, siendo el suelo uno de los más afectados ocasionando la disminución de la microbiología edáfica entre ellos microorganismos beneficiosos que no es el objetivo al momento de su aplicación (Acosta y Gil, 2015).

Según Delgado *et al.* (2018), el uso indiscriminado de insecticidas como el Carbofuran por los agricultores que se dedican a la siembra de café y plátano en las zonas rurales se ha incrementado notoriamente en el control de plagas y con ello mueren los microorganismos benéficos para el suelo. Motivo por el cual la presente investigación se sustenta en conocer el efecto de este compuesto químico en bacterias del género *Azotobacter* ya que generan beneficios para el suelo y las plantas mediante el proceso de fijación de nitrógeno.

La presente tesis de investigación está estructurada en seis capítulos: en el capítulo I se abordó el marco teórico considerando los antecedentes y las bases teóricas especializadas que sirvieron de sustento al presente estudio; en el capítulo II se detalló la metodología y los materiales utilizados en los bioensayos de toxicidad tomando en cuenta el diseño de investigación, en el capítulo III se mostraron los resultados de las evaluaciones de los ensayos, incluyendo los datos estadísticos procesados. Finalmente, en los capítulos IV, V y VI se registraron las discusiones, conclusiones y recomendaciones, respectivamente.



# OBJETIVOS

## Objetivo General

Determinar el efecto del Carbofuran en la población de *Azotobacter* spp. en suelo cafetalero del caserío La Primavera, Provincia de Moyobamba.

## Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización físico – química del suelo para reconocer las condiciones adecuadas para la vida de las bacterias *Azotobacter* spp.
- Evaluar el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres tratamientos de Carbofuran aplicado al suelo en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran aplicado al suelo en condiciones de campo.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

#### 1.1.1. Internacional

Rivera *et al.* (2010) desarrollaron un trabajo de investigación sobre el efecto de diferentes plaguicidas en el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*, donde el objetivo fue evaluar el efecto del Carboxamide, Imidacloprid, Cipermetrina, Fenoxibencilo, Fluometuron y Glifosato, sobre la viabilidad del inoculante biológico Monibac, desarrolladas en el Laboratorio de Microbiología de suelos (CBB-Corpoica C.I. Tibaitatá), Colombia. El proyecto de investigación presentó un proceso experimental explicativo, donde utilizó un diseño de bloques completamente aleatorio (DBCA). La metodología consistió en utilizar cepas de *A. chroococcum* AC1, la misma que fue aislada de cultivos de algodón de la estación experimental Motilonia, Cadazzi-Cesar. La reactivación del inóculo fue realizada mediante un medio de cultivo agrícola a través de una siembra por agotamiento; seguidamente, estas fueron incubadas por un periodo de 48 horas a  $30 \pm 2$  °C, realizando tinción de Gram para confirmar la pureza de la cepa. Los datos fueron analizados a través de un diseño estadístico de comparación de medias y análisis de varianza mediante la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad usando SPSS, versión 17. Los resultados mostraron que las bacterias fueron susceptibles frente al insecticida Cipermetrina al 50 %, individualmente y al ser mezclado con los demás plaguicidas en las dosis utilizadas en campo. Además, determinaron que no hubo efectos significativos ( $P < 0,05$ ) en la aplicación de los plaguicidas Carboxin, Thiram, Imidacloprid, S-metolachloro, Fluometuron y Glifosato, sobre el crecimiento de *A. chroococcum* AC1, bajo las diferentes dosis evaluadas; estableciendo de esta manera que la bacteria objeto de estudio en condiciones de laboratorio tiene la capacidad de tolerar estas sustancias químicas a través de diferentes mecanismos fisiológicos que presenta sin afectar su crecimiento.

Angelini *et al.* (2013) realizaron una investigación sobre los efectos de los pesticidas en las bacterias fijadoras de nitrógeno en el área de cultivo de maní, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de dos herbicidas de preemergencia (S-metolaclo y Diclosulam), tres herbicidas de postemergencia (Imazetapir, Imazapic y Glifosato), un insecticida (Gamma+Cihalotrina y lambda-cihalotrina) y un fungicida (Azoxistrobina + Ciproconazol), sobre las bacterias Rizobianas (*Rhizobium*), desarrollados en el Laboratorio de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. La investigación fue experimental siguiendo un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con cuatro repeticiones. La metodología desarrollada fue basada en realizar ensayos en campo e invernadero; para los experimentos de campo acondicionaron microparcels en 10 m<sup>2</sup>, con tres repeticiones cada una, más una muestra control; donde semillas de maní Oleico fueron sembrados a mano en cada microparcels; seguidamente, la primera aplicación de herbicidas e insecticidas fue a los dos días y la segunda aplicación fue a los 45 días después de la siembra. Para las pruebas en invernadero tomaron treinta y seis muestras de suelo inalterado del campo sin tratamiento agroquímico, los cuales fueron colocados dentro de una bolsa plástica y posteriormente procedieron a la siembra de una semilla de maní esterilizada en la superficie a 5 cm de profundidad. Después de 2 días agregaron un agroquímico diferente a cada bolsa equivalente a la concentración utilizada en el campo. Para el análisis de los datos utilizaron el análisis de varianza ANOVA del software Infostat; las diferencias entre los tratamientos fueron detectados mediante la prueba ISD. Los resultados de los estudios realizados en condiciones de campo demostraron que los plaguicidas afectaron negativamente el número y la actividad nitrogenasa de las poblaciones diazotróficas del suelo. Los efectos de agroquímicos no fueron transitorios, ya que estos parámetros no se recuperaron a los niveles previos al tratamiento ni siquiera 1 año después de la aplicación de los plaguicidas. Mientras que los resultados obtenidos de los experimentos de invernadero revelaron que la adición de herbicidas o fungicidas disminuyó el número de *Diazótrofos* vivos alcanzando los niveles encontrados en el suelo modificado con los pesticidas y que el número de *Diazotrofos* simbióticos no se vio afectado. Concluyeron que el uso de estos plaguicidas puede alterar significativamente la composición de la comunidad bacteriana diazotrófica y reducir la nitrogenasa del suelo.

Chaves *et al.* (2013) realizaron una investigación sobre el efecto de la aplicación de agroquímicos en el cultivo de arroz sobre microorganismos del suelo, donde el objetivo principal fue evaluar el efecto del Glifosato, Dispirilina, Azoxistrobina y Malatión, sobre los

microorganismos edáficos en un Oxisol cultivado con arroz seco en los Llanos Orientales de Colombia. La investigación fue experimental con un diseño de bloques aleatorizados (DBCA). La metodología consistió en preparar (arado) el terreno agrícola (30 bloques de 100 m<sup>2</sup>) un mes antes de la aplicación de los agroquímicos, para el cual definieron 4 Tratamientos con diferentes dosis por cada sustancia. Seguidamente, procedieron a la aplicación del Glifosato en una dosis de 2,5 L/ha (Tratamiento 1) como herbicida pre-emergente; acto seguido, 12 días después realizaron la siembra del arroz al voleo; más adelante, 20 días después de la germinación aplicaron el herbicida Bispiribac en una dosis de 0,4 L/ha (Tratamiento 2) para las malezas y gramíneas de hoja angosta; posteriormente, 40 días después de la germinación aplicaron el fungicida Azoxystrobin a razón de 0,5 L/ha (Tratamiento 3) para el manejo de hongos en el cultivo; finalmente, 65 días después de la germinación aplicaron el insecticida Malatión en una dosis de 1,5 L/ha (Tratamiento 4). Para el conteo de microorganismos tomaron 5 muestras compuestas de suelo rizosférico de 500 g tomados antes y 3 días después de la aplicación de cada sustancia, donde realizaron el conteo de microorganismos empleando dilución en placa con medios específicos para cada grupo microbiano. Los conteos de microorganismo fueron analizados en el software Minitab 14 empleando el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los resultados obtenidos mostraron que en el recuento encontraron bacterias Gram (+), Gram (-), actinomicetos y grupos funcionales fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fósforo junto con los hongos *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. En cuanto al efecto de estas sustancias, los hongos, actinomicetos y solubilizadores de fósforo fueron los microorganismos más afectados por los agroquímicos quienes presentaron reducciones significativas en su abundancia cuando aplicaron el Glifosato, Bispiribac y Azoxystrobin; a diferencia de las bacterias, quienes presentaron comportamientos variables según el agroquímico aplicado. Concluyeron que las bacterias mostraron comportamientos versátiles que pueden afectar de distinta manera los microorganismos que se encargan de la descomposición de la materia orgánica.

Delgado y Fajardo (2015) desarrollaron una investigación sobre la determinación de la movilidad del activo Carbofuran en suelos de cultivo de papa ubicado en el municipio de Villapinzón – Cundinamarca, donde tuvieron como objetivo evaluar la movilidad del plaguicida a distintas profundidades del suelo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), desarrollados en el Laboratorio de la Universidad Santo Tomás, Colombia. La

investigación fue de tipo experimental explicativo, con un diseño completamente aleatorizado (DCA). La metodología consistió en tomar 12 muestras de suelo a 3 diferentes niveles de profundidad de un punto específico de la finca. Definieron 3 Tratamientos diferentes, los cuales fueron diferenciados por alturas del suelo; el Tratamiento 1 refería una altura de 20 cm, el segundo de 40 cm y el tercero de 60 cm de profundidad, con 3 repeticiones cada uno y un testigo. Para la recolección de las muestras de suelo utilizaron columnas de PVC con un diámetro de 7,62 cm, donde 4 de ellos tenían 30 cm de altura (20 cm de suelo), 4 presentaban una altura de 50 cm (40 cm de suelo) y las 4 últimas tenían una altura de 70 cm (60 cm de suelo). Seguidamente, aplicaron a cada columna un total de 700 ml de agua destilada (100 ml/día); posteriormente, aplicaron 456 ml de Carbofuran (Carbofed) diluido en agua a cada columna (228 ml en el día 1 y 228 ml en el día 8), los cuales fueron evaluados durante 10 días. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el método estadístico ANOVA, mediante pruebas de normalidad y comparaciones múltiples (DMS), del Software SPSS. Los resultados determinaron que en las tres profundidades de suelo pudo evidenciarse más del 98 % de retención del ingrediente activo Carbofuran, esto debido a las características físicas y químicas obtenidos en las muestras de suelo, donde la materia orgánica, textura y pH presentaron mayor influencia en la movilidad del Carbofuran, es decir, estos factores fueron determinantes para la adsorción y retención de plaguicidas en las tres muestras del suelo, concluyendo que la movilidad del Carbofuran depende de la presencia de materia orgánica, la estructura física y química presente en el suelo; asimismo, observaron que tiene que pasar mucho tiempo para que el activo de este plaguicida vaya desapareciendo.

Gulhane *et al.* (2015) realizaron un trabajo de investigación sobre la influencia de los plaguicidas en las bacterias fijadoras de nitrógeno, donde tuvieron como objetivo el estudio del efecto de los plaguicidas Hilcyperil y Nuvan sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno *Rhizobium* spp. y *Azotobacter* spp., desarrollados en el Laboratorio del Colegio de Ciencias Shri Shivaji Educación Society Amravati's (SSESA), La India. El estudio de investigación fue experimental, con un diseño completamente al azar (DCA). La metodología consistió en recolectar nódulos de raíz de plantas de soja y guisantes para el aislamiento e identificación de las bacterias *Rhizobium* spp., los cuales fueron esterilizados con alcohol de 95 % durante 4 minutos, lavado con hipoclorito de calcio (10 g/150 ml de agua destilada) y triturado; el material triturado fue transferido a 5 ml de solución estéril de agua, de los cuales 0,1 ml fue extendida sobre la superficie de agar manitol extracto de levadura (YEMA); seguidamente,

las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 horas. Para el aislamiento de *Azotobacter* spp. recolectaron 8 muestras de suelo (1 g) de la filosfera de las cuatro plantas como: maíz (*Zea mays* Linneo), algodón (*Gossypium hirsutum* Linneo), dedo de dama (*Abelmoschus esculentus* Moench) y berenjena (*Solanum melongena* Linneo), los cuales fueron mezcladas con agua destilada estéril (9 ml) en tubos de ensayos; posteriormente, tomaron 1 ml de cada muestra para ser inoculadas en placas con agar glucosa Ashby y finalmente incubadas a 28 °C durante 48 horas. Los resultados indicaron que las bacterias fijadoras de nitrógeno fueron inhibidas por ambos pesticidas. En las muestras de suelo encontraron que las bacterias (*Azotobacter* spp) de las filosfera de las plantas fueron inhibidas por Hilcyperil y Nuvan a razón de 20 y 24 mm para la berenjena y maíz, 16 y 26 mm para algodón y 19 y 24 mm para el dedo de dama. La investigación de los nódulos radiculares determinó que las bacterias (*Rhizobium* spp) fueron inhibidas por Hilcyperil y Nuvan a razón de 20 y 22 mm para la raíz de soja y 14 y 10 mm para la raíz de guisantes, respectivamente. Concluyeron que los pesticidas tienen resultado diferencial en el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno y su acción varía de acuerdo con el lugar y dosis de aplicación, lo cual implica una reducción en el rendimiento de las plantas.

Kareem y Hasan (2018) realizaron una investigación sobre el efecto de las concentraciones de residuos de plaguicidas en el crecimiento de algunas bacterias del suelo. El objetivo del estudio fue utilizar tres tipos de plaguicidas para el control de arbustos de trigo (Topic 100 Ec, Granistar 75 DF y Jantastar – 75 DF) en el crecimiento y actividad de tres bacterias con el fin de determinar el efecto en la degradación de los plaguicidas que se encuentran en el suelo, desarrollados en el Laboratorio de la Universidad de Kufa, Iraq. La investigación fue experimental y explicativo, con un diseño completo al azar (DCA). La metodología consistió en obtener y propagar tres bacterias (*Bacillus subtilis* Ehrenberg, *Azospirillum brasilense* Tarrand *et al.* y *Azotobacter chroococcum*) en un medio de cultivo NA en placas Petri y tubos de ensayo, los cuales fueron incubados a 30 °C hasta su uso. Para el crecimiento de las bacterias prepararon agar nutritivo en placas petri, sembraron y los mantuvieron bajo refrigeración a una temperatura de 2 °C. Seguidamente, las muestras de suelo fueron esterilizadas y distribuidas en una bolsa plástica de 150 g con 5 ml de bacterias en crecimiento en medio BN de 48 horas, agregaron 15 ml de cada pesticida en cuatro concentraciones diferentes (cero, dosis completa, media dosis y doble dosis) y fueron incubados a 30 °C durante 4 semanas. El análisis de los datos fue realizado mediante un

ANOVA; asimismo, los promedios fueron comparados utilizando la diferencia mínima significativa y el nivel de probabilidad (0,05) en el software SPSS. Los resultados determinaron que el plaguicida Jantastar mostro un mayor efecto en número de celdas sobre *B. subtilis* ( $223,49 \times 10^7$  células/ml de medio) en comparación con el Granistar ( $181,83 \times 10^7$  células/ml de medio) durante 4 semanas. Para las bacterias *A. brasilense*, los pesticidas Granistar, Jantastar y Topic presentaron un efecto más significativo sobre la reducción en el crecimiento de las células bacterianas en la dosis doble, alcanzando un promedio de  $197,22 \times 10^7$  células/ml de medio, donde el Granistar mostró el efecto más bajo ( $119 \times 10^7$  células/ml de medio). En las bacterias *A. chroococcum*, el Granistar y Jantastar, redujeron el crecimiento en un total de  $183,16 \times 10^7$  células/ml de medio y  $248,49 \times 10^7$  células/ml de medio; mientras que el Topic redujo el crecimiento bacteriano en un promedio de  $259,08 \times 10^7$  células/ml de medio. En conclusión, determinaron que los plaguicidas utilizados mostraron un efecto significativo en el crecimiento bacteriano, donde el incremento en la concentración de cada plaguicida redujo el crecimiento de bacterias, mostrando una relación entre la concentración y el efecto.

Udochukwu *et al.* (2018) realizaron un estudio sobre los efectos de la aplicación de un pesticida en el crecimiento de bacterias nitrificantes del suelo, donde tuvieron como objetivo determinar los efectos del pesticida Lindano sobre las bacterias *Nitrosomonas* spp., desarrollado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Benin. El desarrollo de la investigación fue experimental con alcance explicativo, donde utilizaron un diseño completo al azar (DCA). La metodología consistió en aislar y caracterizar bacterias nitrificantes (*Nitrosomonas* spp.) presentes en muestras de suelos de 5 lugares diferentes dentro de la universidad, utilizando como medio Winogradsky para la fase 1 de nitrificación. Posteriormente, procedieron con la preparación de diluyentes para los diferentes estados de toxicidad a base de Nitrito de sodio (0,25 mg de  $\text{NaNO}_2$ /caldo Winogradsky) y sulfato de amonio (5,0 mg  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /caldo Winogradsky), los cuales fueron esterilizados a  $121^\circ\text{C}$  y 15 psi, durante 15 minutos; asimismo, usaron concentraciones de insecticida de 120, 140, 160, 180 y 200 ppm y una muestra control con diluyente puro  $(\text{NH}_4)_2$  para la determinación de la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ). Para las pruebas de toxicidad aguda, 10 ml de cada una de las concentraciones de tóxico (90 ml) fueron inoculadas en matraz aforado de 250 ml; seguidamente, determinaron el contenido de nitrato e inocularon placas ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) de las distintas concentraciones de tóxico después de intervalos de 1, 2, 3

y 4 horas, durante 72 horas. Para el análisis de los datos obtenidos y la determinación de la  $CE_{50}$  Y  $CL_{50}$  utilizaron el análisis Probit del software SPSS. Los resultados determinaron que las muestras de suelo dieron positivo para la presencia de *Nitrosomonas* spp.; después de 4 a 5 días de crecimiento, los recuentos de *Nitrosomonas* spp. obtenidos del medio Winogradsky variaron de  $4,8 \times 10^3$  hasta  $9,2 \times 10^3$  ufc/g. Asimismo, el crecimiento de bacterias a una menor concentración de pesticida presentó un incremento que comenzó a disminuir al aumentar las dosis. El porcentaje de acumulación de nitrito disminuyó gradualmente con el tiempo (1h= 82,16 %; 2h= 56,73 %; 3h= 28,91 y 4h= 11,31 %); además, los valores de la  $LC_{50}$  fueron superiores a la  $CE_{50}$  en todos los intervalos de tiempo, donde a las 4 horas de exposición alcanzaron valores de 256,54 y 22,38, respectivamente. En conclusión, estos resultados demostraron que las bacterias pudieron sobrevivir y crecer a concentraciones más bajas de plaguicidas; sin embargo, estas fueron inhibidas por completo a concentraciones más altas de plaguicidas.

Qardash *et al.* (2019) realizaron una investigación sobre el efecto de seis pesticidas en bacterias del suelo bajo condiciones de laboratorio, donde tuvieron como objetivo evaluar el efecto de los pesticidas Supermectina, Novacron, Mores Agrinate, Shahin y Mark a tres concentraciones diferentes (25, 50 y 100 %) sobre una determinada cantidad de bacterias, desarrollados en el Laboratorio de Microbiología, perteneciente al Ministerio de Salud, Yemen. La investigación fue experimental y explicativo, con un diseño de bloques completamente aleatorizado (DBCA). La metodología consistió en recolectar cinco muestras de suelo de los campos de cultivo de maíz de la ciudad de Al dhale'e a una profundidad de 15 cm, los cuales pasaron por un tamiz de 2 mm; seguidamente, todas las muestras fueron combinadas, de los cuales seleccionaron 1 g para ser mezclada en un tubo de ensayo con 99 ml de agua esterilizada; a continuación, 1 ml de este suspendido fue añadido a otro tubo de ensayo con 9 ml de agua esterilizada, obteniendo una dilución de  $10^{-1}$ . Para el aislamiento de las bacterias utilizaron medio de agar nutritivo los cuales fueron vertidos en placas Petri hasta quedar mezclado con el suelo. Posteriormente, aplicaron 100  $\mu$ l de la solución de 1 a 4 diluciones, fueron esparcidas en un medio nutritivo que contenía diferentes concentraciones de pesticidas (25, 50 y 100 %); finalmente, todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas. Los datos experimentales fueron procesados por el método de dispersión de análisis matemático utilizando el software para PC Microsoft Office Excel. Los resultados determinaron que los pesticidas Agrinate, Supermectina y Novacron



produjeron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las bacterias en todas las concentraciones utilizadas (25, 50 y 100 %), mientras que los pesticidas Shahin, Mark y Mores no registraron efecto inhibitor en el recuento bacteriano a una concentración de 25 %. Concluyeron que el efecto de estos insecticidas sobre las bacterias del suelo dependió de la dosis o concentración que utilizaron; además, el impacto obedece a la interacción entre los microorganismos y las sustancias activas, ya que estos pueden desarrollar la capacidad de utilizar un pesticida aplicado como fuente de energía y crecimiento.

AL-Ani *et al.* (2019) realizaron un estudio sobre el efecto de los plaguicidas en los microorganismos del suelo, donde tuvieron como objetivo evaluar la influencia del herbicida Glyset IPA (Glifosato 48 %) y los insecticidas Miraj (Alfacipermetrina 10 %) y Malatión (50 % WP) en el recuento de microorganismos del suelo y las actividades microbianas en forma de producción de CO<sub>2</sub>, desarrollado en el Laboratorio de la Universidad de Mosul, Irak. El proyecto de investigación fue experimental y factorial, con un diseño completamente al azar (DCA). La metodología consistió como primer paso en tomar muestras de suelo de la superficie (0-20 cm) del área de Alrashedia, los cuales fueron tamizados (2 mm) e identificados. Para las pruebas definieron 12 tratamientos (4 por cada plaguicida), con 3 repeticiones cada una; colocaron 200 g de suelo tamizado en un matraz de 250 ml (36 en total), a los que añadieron diferentes concentraciones de cada plaguicida (0, 50, 100 y 200 ppm) según corresponda. Finalmente, fueron evaluados durante 7 semanas. Para el análisis de los datos utilizaron el diseño estadístico ANOVA, y las medias fueron comparados mediante la prueba de LSD con diferencia mínima significativa ( $p < 0,05$ ). Los resultados demostraron que en la primera semana la adición de Glyset, a los 50, 100 y 200 ppm, redujo el recuento de bacterias en un 4, 11 y 13 % respectivamente; a las 7 semanas de incubación, la reducción fue del 6, 9 y 9 %. En la primera semana de incubación, la adición del Miraj a 50, 100 y 200 ppm redujo el recuento de bacterias en un 18, 24 y 32 % respectivamente; a las 7 semanas, la reducción fue de 9, 17 y 45 %. La adición del Malation a los 50, 100 y 200 ppm, disminuyó el número de bacterias en un 40, 42 y 59 % respectivamente; a la semana 7, la reducción fue del 32, 38 y 41 %. La adición de Glyset a 200 ppm, disminuyó el recuento de hongos en un 20 y 13 % en la primera y séptima semana; además, como resultado de la adición del insecticida Miraj durante la séptima semana a los 50, 100 y 200 ppm, la población de actinomicetos disminuyó en un 63, 64 y 69 % respectivamente. Concluyeron que los

plaguicidas afectan negativamente los recuentos microbianos y la actividad de los mismos en el suelo, lo que confirma y refuerza preocupaciones ambientales previamente reportadas.

Garmashov *et al.* (2021) realizaron una investigación sobre el desarrollo de *Azotobacter* en Agrocecosis saturadas con herbicida que contiene Glifosato, cuyo objetivo fue evaluar el efecto a largo plazo del herbicida Tornado 500 (Glifosato) sobre el número de *Azotobacter* presente en el suelo sin labranza (siembra directa) encontrado en la región económica de la Tierra Negra Central, desarrollados en el laboratorio del Centro Federal de Investigación Agrícola, Rusia. El proyecto fue experimental y presentó un diseño aleatorio (DCA). La metodología consistió en preparar el terreno con variantes de arado a una profundidad de 20-22 cm (labranza habitual en la planta Central de Chernobil,) sin uso del Glifosato y terreno sin labranza (uso de glifosato) para las evaluaciones, en las que utilizaron el herbicida Tornado-500 BP a razón de 2,5 L/ha. Establecieron una prueba de microcampo para evaluar el impacto del aumento de las tasas de Glifosato en ambos suelos, donde establecieron concentraciones de 3, 6 y 9 L/ha. Para los análisis microbiológicos tomaron muestras representativas de suelo mixto de cada objeto de estudio a una capa de 0-20 cm, dos veces durante la temporada de crecimiento bajo rotación de cultivos en el primer experimento estacionario. Los datos experimentales fueron procesados por el método de dispersión de análisis matemático utilizando el software para PC Microsoft Office Excel 2016. Los resultados de los estudios realizados en las muestras de suelo tomadas anualmente determinaron que el uso del herbicida glifosato tuvo un mayor efecto negativo en suelo superficial de 0-5 cm, presentando una disminución de cuatro veces en el número de *Azotobacter* (305 a 74), mientras que con un aumento en el espesor de la capa estudiada a 0-20 cm, el efecto del ácido glifosato sobre la biota del suelo fue significativamente menor. Asimismo, un aumento en la tasa recomendada del uso del glifosato (3,0 L/ha) en tres veces (9,0 L/ha), redujo el número de *azotobacter* en la capa del suelo de 0-5 cm por 20 veces. En conclusión, los estudios realizados determinaron que existe una dependencia entre el número de bacterias sobrevivientes del género *Azotobacter*, con el periodo y dosis de aplicación del Glifosato.

### **1.1.2. Nacional**

Avellaneda (2022) desarrolló una investigación con la finalidad de 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, la investigación fue de tipo experimental con un diseño completamente al azar (DCA). La metodología consistió en acondicionar un invernadero dentro del Laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Católica Sedes Sapientiae Filial Rioja: Nueva Cajamarca, por un periodo de 120 días. Preparó un caldo de (1 kg/200 L de agua) del herbicida Octano, una subdosis y tres sobredosis con cinco tratamientos y cinco repeticiones en vasos de precipitado con 500 g de suelo; posterior a ello agregó por tratamiento gránulos de suelo contaminado con glifosato en la placa Petri preparada con 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 según dosis empleadas en el experimento afectó el pH del suelo de manera significativa (KW = 21,409, p-value = 0,000 262 7), en un proceso temporal de acidificación que fue desde 5,23 hasta 3,88. Concluyó que el herbicida 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.

## **1.2. Bases teóricas especializadas**

### **1.2.1. Los insecticidas en la agricultura**

El control de plagas en el desarrollo de la agricultura depende en gran medida del uso de productos químicos sintéticos de origen industrial como insecticidas, los cuales ofrecen una efectividad instantánea frente a estos individuos que resultan una amenaza para la rentabilidad en la producción de diferentes cultivos. Si bien este método ayuda a mantener la población de plagas a un nivel tolerable, su abuso ha causado varios problemas ecológicos,

entre ellos: contaminación del suelo, aguas subterráneas, efectos tóxicos en animales y humanos, genotipos de resistencia, etc., además, los enemigos naturales de las mismas plagas y de otros organismos que ante la ausencia de sus reguladores se convierten en plagas secundarias, desencadenando así un desequilibrio ecosistémico. Las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas son muy preocupantes, razón por el cual estos compuestos son considerados como una de las herramientas agrícolas más relacionadas con el daño ambiental, por lo que puede tener efectos letales o subletales en organismos que no son su objetivo (por ejemplo, recicladores de nutrientes del suelo, polinizadores de plantas y depredadores de plagas) y reducir o contaminar productos alimenticios para niveles tróficos superiores (Ruiz, 2015).

Desde el momento en que el hombre empezó a realizar la expansión agraria se vio en necesidad de combatir y controlar insectos que afectaban sus cultivos usando resinas capaces de exterminarlos; a partir de la revolución industrial y la ampliación de zonas urbanas que dependían de la agricultura para su alimentación, se notó claramente un aumento en la elaboración de sustancias químicas con bajos costos como parte del sostén del progreso agrícola e industrial, sin embargo, con el transcurrir de los años el uso desmedido ha ocasionado grandes conflictos ambientales, obstaculización en la conservación los recursos naturales (RRNN) y ecosistemas ambientales, perturbando el bienestar de los consumidores urbanos y de las poblaciones rurales (Del Puerto *et al.*, 2014).

### ➤ **Carbofuran**

Acaricida e insecticida de contacto sistémico usado en una gran variedad de cultivos agrícolas, muy soluble en agua y presenta un alto nivel de contaminación por lixiviación en aguas subterráneas; así mismo, puede afectar a las plantas a nivel de microorganismos y macroorganismos dependiendo de la concertación y de los procesos físicos en el suelo; además, es absorbido por vía radical para luego ser transportado a la parte aérea de la planta sin alcanzar el fruto (Alza *et al.*, 2016).

El Carbofuran 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il-metilcarbamato es una sustancia orgánica conformada con ácido carbámico, y un átomo de nitrógeno, de baja estabilidad

química y es altamente tóxico (Delgado y Fajardo, 2015). en la Figura 1 se muestra la estructura molecular:

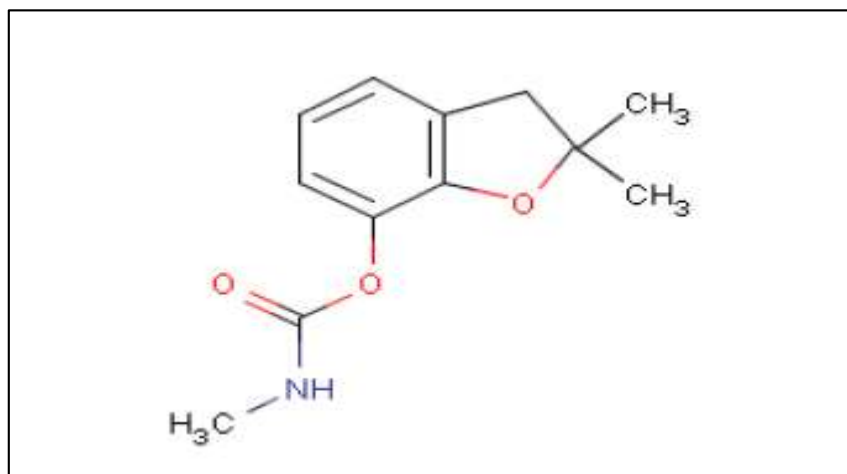


Figura 1. Estructura química del Carbofuran. Fuente: Delgado y Fajardo (2015).

## ➤ Comportamiento de Carbofuran en el suelo

### a. Persistencia del Carbofuran

Este compuesto químico queda retenido en la materia orgánica y arcilla del suelo por intercambio iónico, por puentes de hidrógeno, enlace por transferencia de carga, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Una vez que este insecticida es dispuesto al suelo, presenta una vida media entre dos y ocho semanas; sin embargo, esta permanencia se encuentra condicionada por factores ambientales y parámetros del suelo, los cuales determinan la presencia de esta sustancia. El Carbofuran presenta más estabilidad en suelo neutro y ácido que en suelo alcalino (Castellanos, 2008).

### b. Movilidad del Carbofuran

El Carbofuran es un compuesto bastante móvil, sobre todo en suelos arenosos debido a que presentan una alta percolación; sin embargo, en suelos con alto porcentaje de arcilla y materia orgánica, la movilidad de esta sustancia es más lenta (Castellanos, 2008).

El Carbofuran al liberarse en la atmósfera en fase de vapor y partículas es degradado por el proceso de hidrólisis; es decir, es un proceso mediante el cual se produce la ruptura de las moléculas de la sustancia por acción del agua. El Carbofuran en el aire tiene aproximadamente una vida media de trece horas y sus partículas se dispersan por precipitación, a diferencia de que en el suelo tiene una durabilidad entre uno y tres meses, lo cual depende de las características intrínsecas del suelo (Pozo, 2013).

### c. Comportamiento de Carbofuran en la biota

El Carbofuran es fácilmente absorbido por las raíces de las plantas y a la vez es transportado a zonas de transpiración. El metabolito activo de este compuesto en plantas es 3-cetocarbofuran, el cual es rápidamente hidrolizado a un metabolito menos tóxico denominado 3-cetocarbofuran-7-fenol (Figura 2) (Castellanos, 2008).

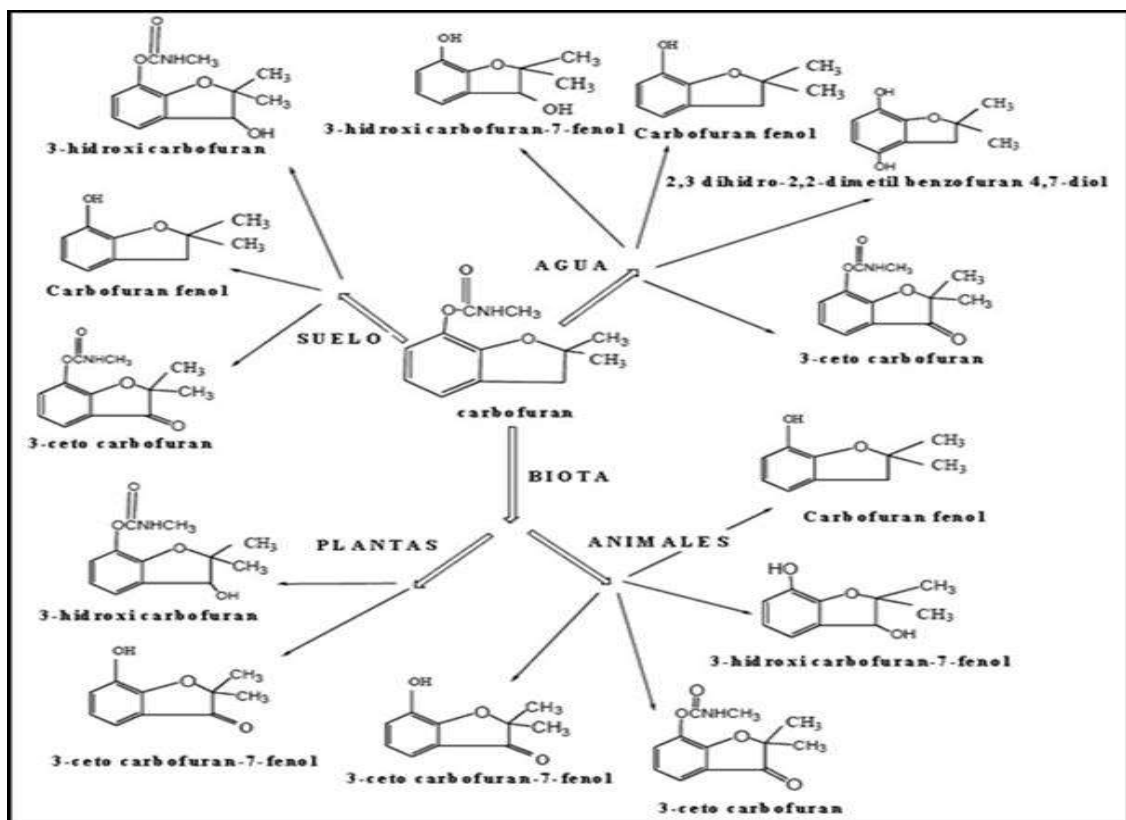


Figura 2. Destino ambiental del Carbofuran. Fuente: Castellanos (2008).

Asimismo, Castellanos (2008), hace referencia a que los microorganismos del suelo son sensibles al Carbofuran, la lombriz de tierra y las bacterias fijadoras de nitrógeno son susceptibles con un valor  $CL_{50}$  en suelo de 0,5 ppm a las 5 horas.

### **1.2.2. Importancia de los microorganismos en la fertilidad del suelo**

Según Suquilanda y Manuel, (1995), los microorganismos son muy importantes para el ecosistema y la fertilidad del suelo, quienes también contribuyen de manera positiva al establecimiento de los ciclos biogeoquímicos, la formación de numerosas reacciones de oxidación, hidrólisis, degradación de la materia orgánica y el desarrollo del carbono, nitrógeno, fósforo y otros elementos, contribuyendo así al desarrollo de una cubierta vegetal estable con condiciones ideales para las interacciones con otros organismos vivos.

Los microorganismos que existen en la rizosfera son esenciales para el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oxígeno, etc), los cuales intervienen en la formación del suelo; además, estos organismos favorecen a la fertilidad vegetal, resisten patógenos, degradan compuestos extraños y desarrollan la función de producir hormonas vegetales (Nogales, 2005).

### **1.2.3. Población microbiana del suelo**

Uno de los componentes más importantes del suelo son los microorganismos, los cuales son responsables de la descomposición de la materia orgánica, mineralización de complejos orgánicos, el transporte de productos biológicos y elementos minerales y también ayudan a fijar el nitrógeno atmosférico. En un gramo de suelo fértil se encuentran millones de microorganismos beneficiosos para el suelo y los cultivos, entre ellos podemos encontrar: bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoos y virus que controlan las poblaciones de bacterias (Germida, 1993).

### **1.2.4. Bacterias fijadoras del nitrógeno**

Algunas bacterias tienen la función y capacidad de producir la enzima nitrogenasa, la cual se encarga de fijar el nitrógeno; es decir, consiste en reducir el nitrógeno molecular o atmosférico ( $N_2$ ) en amoníaco ( $NH_3$ ) y así dar como resultado compuestos absorbibles y metabolizables por las plantas y seres vivos. Los fijadores simbióticos de nitrógeno están estrictamente asociados con las plantas (Lara *et al.*, 2007).

Algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar directamente nitrógeno en el aire y formar nódulos. Estas bacterias viven en relación con un organismo huésped (plantas), toman el nitrógeno atmosférico hasta convertirlo en iones absorbibles por las plantas y luego ingresan a las vías metabólicas celulares para formar aminoácidos y proteínas. La enzima responsable de romper el enlace que conecta dos átomos de nitrógeno es la nitrogenasa, que requiere de 76 moléculas de ATP por cada reducción de  $N_2$  (Calvo, 2011).

➤ **Bacterias *Azotobacter* spp.**

Son bacterias asociativas de vida libre que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y producir sustancia fisiológicamente activa que contribuyen al crecimiento de las plantas (Rodríguez *et al.*, 2016) (Figura 3).

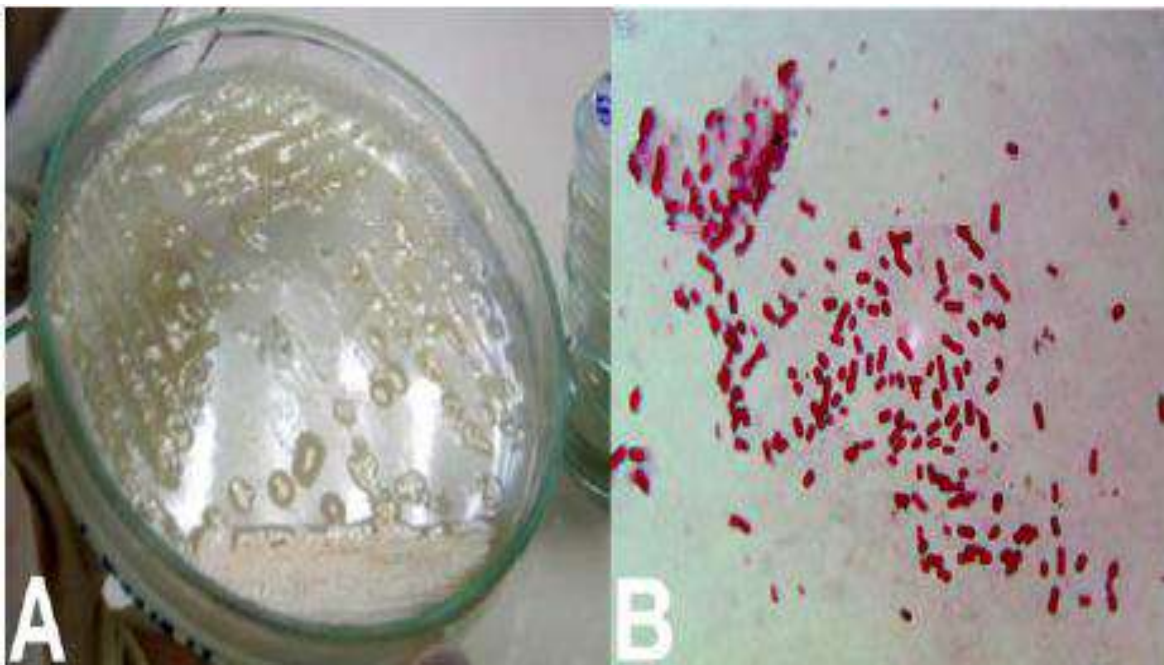


Figura 3. (A) Colonias de *Azotobacter* spp. en medio Ashby. (B) Morfología celular de *Azotobacter* spp. Fuente: Jiménez (2017).

Asimismo, realizan deposiciones metabólicas que liberan enzimas las cuales pueden originar transformaciones fisiológicas y metabólicas en las plantas, estas solubilizan elementos minerales que producen sustancias que estimulan el crecimiento vegetal (Jiménez, 2007).



## ➤ **Funciones**

Sánchez *et al.* (2019), mencionan que las bacterias no simbióticas corresponden al género *Azotobacter* y se caracterizan por fijar nitrógeno, ya que estos utilizan las serosidades de las raíces y suministran a las plantas nitrógeno combinado que secreta durante la adherencia de nitrógeno atmosférico; asimismo, han identificado que las serosidades de las raíces muestran azúcares, fenólicos, vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos y orgánicos, suministrando así a la bacteria su fuente de energía; esta acción asociativa con la planta destella el vigor y engrandecimiento apreciable en la ganancia de nitrógeno.

Esqueche y Quispe (2017), mencionan que las bacterias son de vida libre y tienen la capacidad de fijar un promedio  $20 \text{ kg.h}^{-1}.\text{año}^{-1}$ ; además, están presentes en la mayoría de suelos en un promedio de 104 g de suelo. A partir de ellas se producen, antibióticos, hormonas y estimulantes que contribuyen al crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas; además, producen el sulfuro, hidrógeno, vitaminas, pigmentos, aminoácidos y de manera particular hidrolizan el almidón (Jiménez, 2007).

Bernal (2015), menciona que la bacteria *Azotobacter*, además de fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo, también pueden sintetizar algunas sustancias como la tiamina (vitamina B-1), ácido nicotínico, ácidos pantoténicos, riboflavina y otras sustancias que estimulan las hormonas vegetales, los cuales determinan la germinación de semillas, el crecimiento y desarrollo de determinadas especies vegetales.

### **1.2.5. Medio de cultivo**

#### ➤ **Medio Ashby**

Es un medio libre de nitrógeno que ayuda a identificar las cepas bacterianas utilizadas para la fijación de nitrógeno. Estos microorganismos crecen en medio Ashby y reemplazan el metabolismo del nitrógeno con nitrógeno atmosférico encerrado en el microambiente de la placa de Petri (Salazar y Ordoñez, 2013).

### ➤ **Fijación de nitrógeno**

La fijación de nitrógeno ( $N_2$ ) es llevado a cabo por microorganismos (bacterias) nitrificantes que habitan el suelo como los organismos fijadores en vida libre (*Azotobacter*) y organismos fijadores en simbiosis. El  $N_2$  es captada de la atmósfera en estado gaseoso por estos organismos, quienes gracias a la enzima nitrogenasa que está constituida por: hierro-molibdeno-proteína y hierro – proteína, lo convierten en nitratos, nitritos y amonio. Asimismo, esta enzima necesita la colaboración de la ferredoxina y flavodoxina que actúan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa; posteriormente, los electrones son transportados a la nitrogenasa por la ferredoxina y llegan al hierro – proteína, quienes activan a la Mo- Fe – proteína, produciendo la reducción del nitrógeno para luego ser fijado como compuesto aminado (Lara *et al.*, 2007).

### ➤ **Condiciones para la fijación de nitrógeno**

En la fijación del nitrógeno influyen diversos factores como la acidez o alcalinidad del suelo, temperatura, tipo de especie vegetal que predominan en la zona y la presencia de bacterias nitrificantes (simbióticas y no simbióticas). Específicamente, las bacterias *Azotobacter* prefieren suelos con  $pH > 6$ , temperatura entre los 32 y 40 °C, presencia de oxígeno, etc.; asimismo, la presencia de humedad afecta a los microorganismos por ser aeróbicas. Otros factores como el vanadio, calcio, magnesio, fosforo, azufre, boro, cobalto y molibdeno, también son vitales para la fijación de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) (Constanza *et al.*, 2015).

## **CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Diseño de investigación**

#### **2.1.1. Tipo de investigación**

La presente investigación de diseño experimental, se determinó el efecto de tres dosis de Carbofuran en condiciones de campo e invernadero y se conoció el efecto sobre la población de bacterias *Azotobacter* spp. Tuvo un enfoque cuantitativo porque fue secuencial y probatorio, la cual representó un conjunto de procesos con la finalidad de recolectar información para probar la hipótesis, además, se elaboró un plan (método estadístico) para probar y medir las variables, obtener resultados, realizar su interpretación y discusión; asimismo, se estableció conclusiones con respecto a las preguntas de investigación e hipótesis (Domínguez, 2015).

#### **2.1.2. Lugar y fecha**

El desarrollo de la investigación consistió en dos etapas. La primera etapa se ejecutó en el Laboratorio General de Ciencias Básicas II de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Filial Rioja, departamento de San Martín. La segunda etapa fue en campo y se desarrolló en la finca El Huascarán, ubicado en el caserío La Primavera del Alto Mayo, provincia Moyobamba, departamento de San Martín (Figura 4 y 5), a una altura de 948 m s.n.m., con un clima tropical de sabana semicálida y lluviosa, con temperatura entre 14 y 30 °C.

Las muestras de suelo para su identificación (análisis físico – químico) y los bioensayos de la primera etapa, fueron recolectadas de la finca Huascarán (Tabla 1) en la segunda semana de setiembre del 2020, siguiendo el muestreo sistemático en forma de zigzag y cadena de custodia (Ministerio del Ambiente [MINAM], 2014) (Ver Apéndice 10). Finalmente, para la etapa de campo, las muestras de suelo fueron obtenidas en la cuarta semana de setiembre

del mismo año, los cuales fueron puestas en bolsas herméticas tipo ziploc con capacidad de 1 kg las cuales fueron rotuladas, llevadas y analizadas en el Laboratorio General de Ciencias Básicas II de la Universidad Católica Sedes Sapientiae Filial Rioja.

Tabla 1

Puntos de muestreo de suelo de la finca “El Huascarán” - Primavera del Alto Mayo

<b>Puntos</b>	<b>Coordenadas UTM WGS84, ZONA 18</b>	
	<b>Este (m)</b>	<b>Norte (m)</b>
M1_01	240196	9366325
M2_02	240220	9366353
M3_03	240249	9366355
M4_04	240299	9366426

*Fuente:* Elaboración propia.

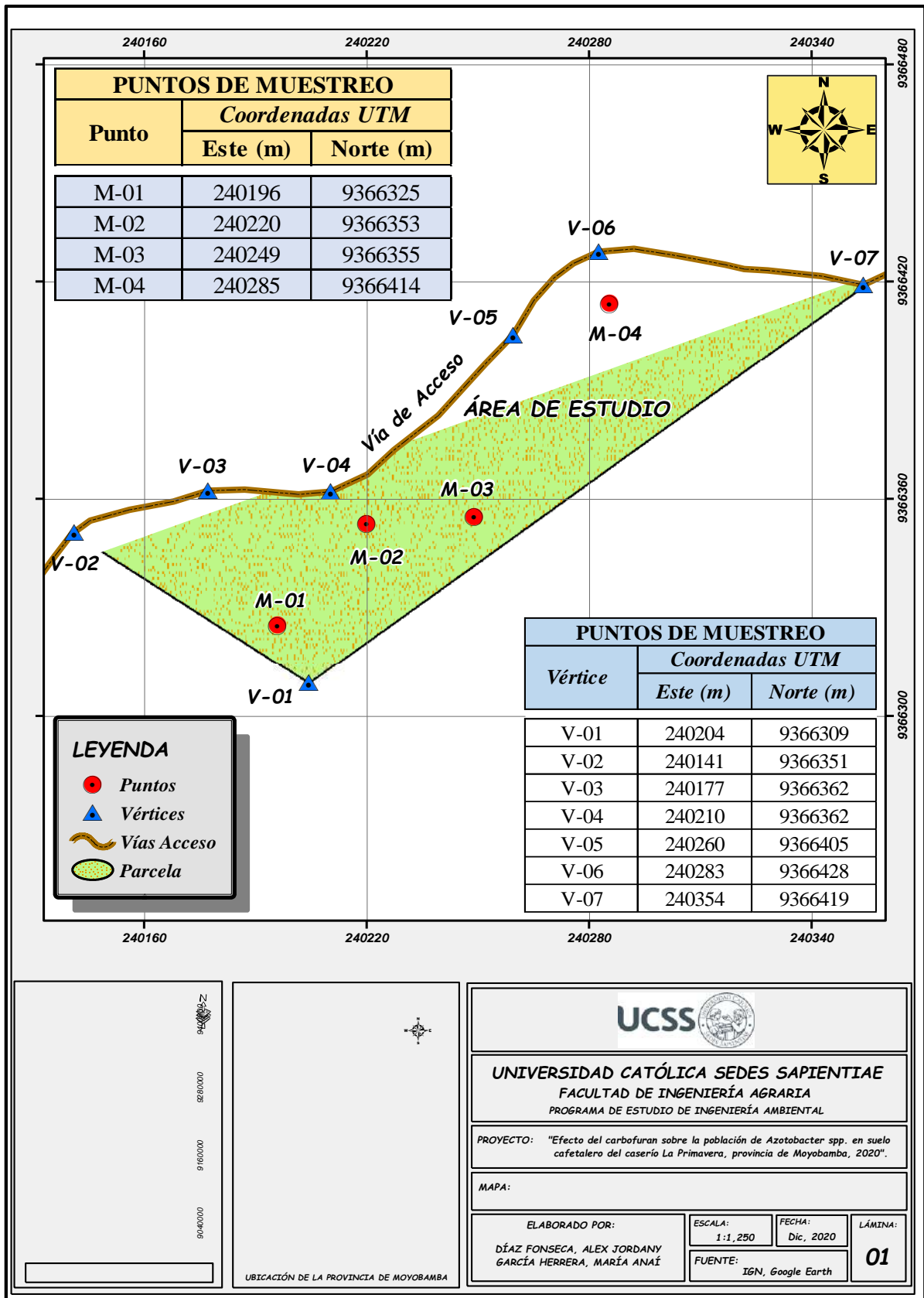


Figura 4. Mapa de ubicación del área de estudio en el sistema de información geográfica.  
Fuente: Elaboración propia.

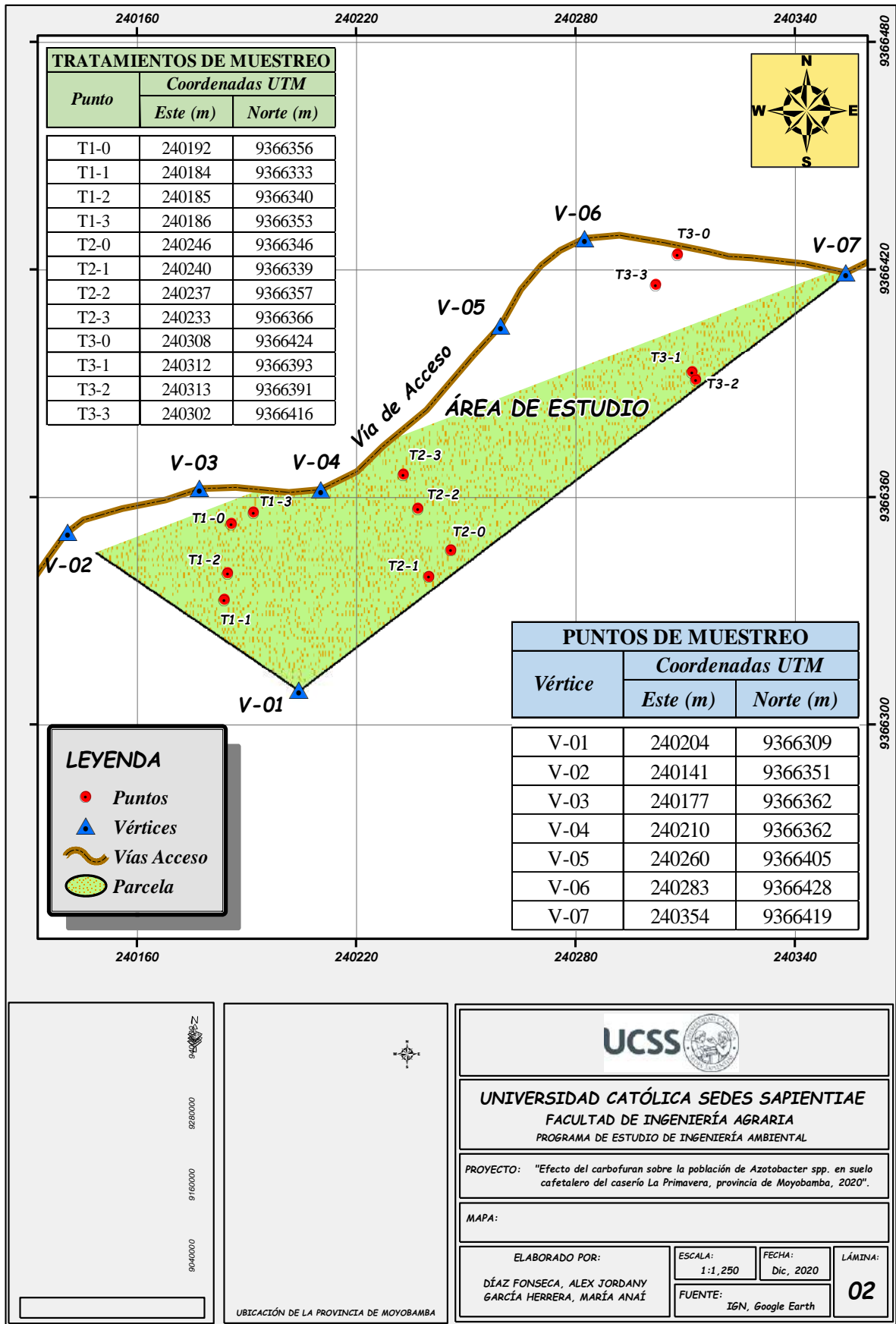


Figura 5. Mapa de ubicación de los puntos de muestreo. Fuente: Elaboración propia.

### 2.1.3. Descripción del experimento

Previo al desarrollo de los bioensayos tanto en fase de laboratorio como de campo, se procedieron a realizar las siguientes actividades:

#### a. Obtención de las muestras de suelo

Para la toma de muestras de suelo que se utilizaron en los bioensayos se identificó la parcela de café “El Huascarán” de 10 000 m<sup>2</sup>, de propiedad del Sr. Alejandro Díaz Alejandría, ubicado en el caserío La Primavera del Alto Mayo, provincia Moyobamba, con coordenadas UTM WGS84 este: 240220 m y norte: 9366353 m, quien mediante carta autorizó la toma de muestras (Ver Apéndice 1). Se recolectaron 25 kg de suelo, realizando calicatas a lo largo del transecto (Figura 6). Las muestras fueron recolectadas siguiendo el muestreo sistemático en forma de zigzag, establecidos por el Ministerio del Ambiente [MINAM] (2014).



*Figura 6.* Excavación de calicatas donde se tomaron muestras de suelo.  
*Fuente:* Elaboracion propia.

Asimismo, para el análisis físico - químico se tomó 1 kg de suelo de cada punto de muestreo, para ello se tuvo en cuenta el siguiente protocolo según Villaseñor (2016) (ver Apéndice 8):

- Identificación de la topografía del terreno.
- Señalización de puntos de muestreo mediante la metodología de zigzag.
- Limpieza del área a muestrear, para eliminar los residuos orgánicos frescos.
- Construcción de una calicata de 30 x 30 cm.
- Con una palana cortar los lados laterales de la muestra.
- Depositar la muestra en un balde limpio o bolsa hermética.

Se realizó la excavación de cuatro calicatas de 30 x 30 cm para ser llevados al laboratorio del Proyecto Especial Alto Mayo (PEAM) y realizar los análisis físicos químicos correspondientes; asimismo, se extrajo 5 kg de suelo adicional para ser llevado al Laboratorio General de Ciencias Básicas N° 02 de la Universidad Católica Sedes Sapientiae.

#### **b. Obtención de la bacteria *Azotobacter* spp.**

La bacteria *Azotobacter* spp. se obtuvo de cepas ya identificadas en la tesis “Efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero el Dorado, provincia de Moyobamba”. Estas cepas se mantuvieron en placas Petri de 100 mm, bajo sistema de refrigeración a una temperatura de 4 °C.

#### **c. Sustancia de prueba**

El insecticida utilizado fue un compuesto formulado que tiene como ingrediente activo al Carbofuran y con nombre comercial Farmadan (Farmagro S.A.), suspensión concentrada, altamente peligroso – franja roja. Insecticida-nematicida de alto efecto residual que actúa por contacto e ingestión sobre una gama de insectos que afectan el follaje de las plantas, inhibiendo la acción de la Acetilcolinesterasa, provocando un aumento de la enzima acetilcolina, produciendo síntomas de hiper excitación, parálisis y hasta provocando la muerte del insecto (Farmagro, s.f.). En el Apéndice 2 se muestra la ficha técnica del insecticida Farmadan.



## FASE DE LABORATORIO

Esta fase del experimento fue desarrollada en el Laboratorio General de Ciencias Básicas II de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Filial Rioja: Nueva Cajamarca, siguiendo la metodología establecida por Jiménez (2007), adaptado al siguiente procedimiento:

### a. Reproducción de *Azotobacter* spp. en placas Petri

El aislamiento y reproducción de colonias de *Azotobacter* se realizó en placas Petri con Agar Ashby-Manitol, siguiendo el protocolo establecido por Jiménez (2007), adaptado al siguiente procedimiento:

- Las placas Petri y pinzas fueron lavados con agua destilada, envueltas en papel bond y posteriormente esterilizados en el horno Pasteur por dos horas a 180 °C.
- Para la preparación del agar Ashby se utilizó 4,07 g/100 ml de agua destilada y puesta en un matraz aforado, sellado con algodón y papel aluminio, para luego ser esterilizado en autoclave durante 30 minutos a 121 °C y 0,11 mega Pascales.
- Posteriormente fue refrigerado durante 24 horas.
- Se procedió a cristalizar con una cocina eléctrica para su posterior agregado a las placas Petri (Figura 7).



Figura 7. Preparación de agar Ashby. Fuente: Elaboración propia.

- Se realizó la siembra en 10 placas Petri de Agar Ashby-Manitol, la cual fueron encubadas por 7 días a 28 °C para poder visualizar colonias separadas mucilaginosas y translucidas (Figura 8). Para observar la morfología de células se realizó la coloración Gram (López *et al.*, 2014) (Figura 9).



Figura 8. Crecimiento de *Azotobacter* spp. en agar Ashby manitol. Fuente: Elaboración propia.

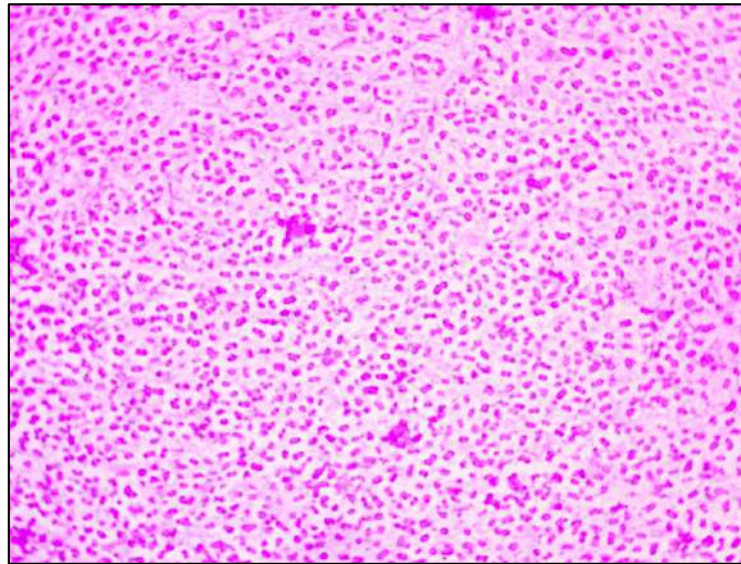


Figura 9. Observación en microscopio de la bacteria *Azotobacter* spp.  
Fuente: Elaboración propia.

- Finalmente, después de haber reproducido e identificado las bacterias *Azotobacter* spp., se realizó la siembra en 24 placas Petri con agar Ashby manitol para ser puestos a evaluación en los bioensayos.

## **b. Acondicionamiento del lugar de trabajo y preparación del suelo**

- Se construyó un invernadero de vidrio de 0,80 m de ancho, 1 m de largo por una altura de 0,40 m (Figura 10).
- Homogenizadas las muestras de suelo, fueron secados al aire libre, tamizados (40 mm), pesados; finalmente, se procedió a colocar 0,5 kg de suelo en vasos precipitados de 500 gr, haciendo un total de 12 muestras.
- Los vasos precipitados con las muestras de suelo fueron codificados de la siguiente manera: T1\_0, T1\_01, T1\_02, T1\_03; T2\_0, T2\_01, T2\_02, T2\_03; T3\_0, T3\_01, T3\_02 y T3\_03, donde los tratamientos T1\_0, T2\_0 y T3\_0 fueron muestras sin Carbofuran; estas mismas tuvieron que ser esterilizadas en el horno Pasteur durante dos horas a 180 °C y posteriormente puesto en el invernadero (Figura 10).



*Figura 10. Muestras de suelo esterilizadas. Fuente: Elaboración propia.*

## **c. Aplicación de Carbofuran en las muestras de suelo**

Los bioensayos fueron realizados con el insecticida Farmadan (Carbofuran), donde se consideraron 3 tratamientos con diferentes concentraciones, más 3 repeticiones cada una y un testigo por cada tratamiento. Se preparó tres diferentes dosis del insecticida en un vaso precipitado de 500 ml (T1= 0,4 ml /200 ml de agua destilada; T2= 0,8 ml/200 ml de agua

destilada y T3= 1,2 ml/200 ml de agua destilada) (Tabla 2 y Figura 11) y se aplicó 10 ml de cada solución a cada muestra de suelo (500 g) según corresponda.

Tabla 2  
Dosis establecidas para cada Tratamiento

Tratamiento	Dosis de Carbofuran
T0	Testigo sin Carbofuran
T1	0,4 ml de Carbofuran en 200 ml de agua destilada
T2	0,8 ml de Carbofuran en 200 ml de agua destilada
T3	1,2 ml de Carbofuran en 200 ml de agua destilada

Fuente: Elaboración propia.

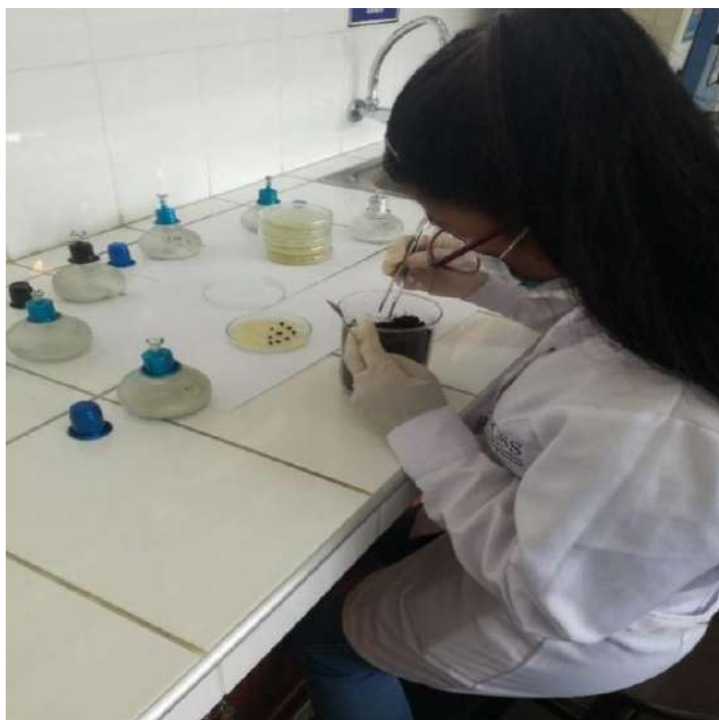


Figura 11. Preparación de las dosis de Carbofuran. Fuente: Elaboración propia.

#### d. Aplicación de suelo contaminado con Carbofuran a las placas Petri

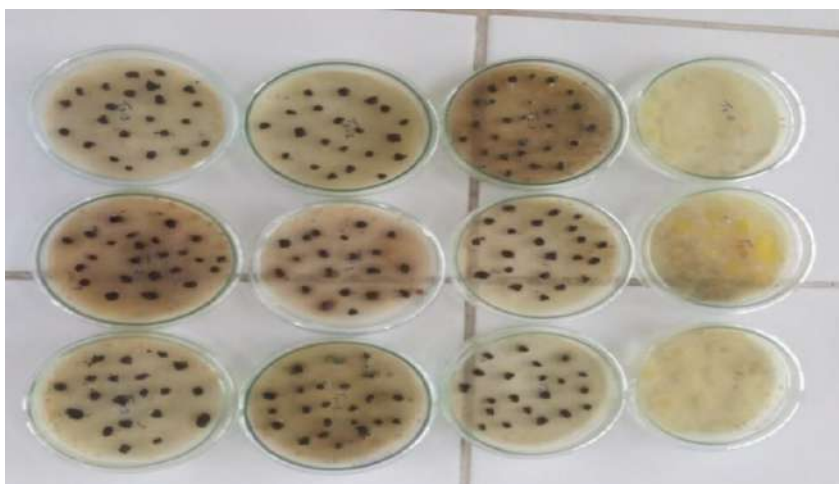
Pasado 24 horas después de haber aplicado las soluciones de Carbofuran por cada tratamiento en las muestras de suelo, se sacaron gránulos de cada vaso precipitado para ser colocados en las placas Petri de Agar Ashby-Manitol con colonias de *Azotobacter* spp. (Figura 12). La aplicación se realizó a una distancia de 1 cm entre cada gránulo, en cada uno de las muestras de suelo, los cuales fueron incubados durante siete días a una temperatura de 32 °C (Jiménez, 2007).





*Figura 12.* Aplicación de gránulos de suelo con Carbofuran. *Fuente:* Elaboración propia.

Pasado 15 días de haber sido aplicado las soluciones de Carbofuran a las muestras de suelo, nuevamente se sacaron gránulos de suelo para ser colocados en las placas Petri con Agar Ashby-Manitol, según corresponda a cada tratamiento y fueron incubados durante siete días a una temperatura de 32 °C. Luego se procedió a la identificación de la cantidad de colonias de bacterias *Azotobacter* spp. en las muestras, mediante la técnica de observación y conteo (Figura 13).



*Figura 13.* Efecto del Carbofuran sobre las bacterias *Azotobacter* spp. *Fuente:* Elaboración propia.

## **FASE DE CAMPO**

La fase de campo se desarrolló en la finca el Huascarán, ubicado en el caserío La Primavera del Alto Mayo, provincia Moyobamba, departamento de San Martín. Para el desarrollo de esta fase se siguió la metodología establecida por Jiménez (2007), donde se realizaron las siguientes actividades.

### **a. Aplicación de Carbofuran a plantas adultas de café**

Se identificaron plantas que tengan las mismas características en cuanto a ramas, altura y frondosidad, posteriormente se realizó la limpieza de las malezas que se encontraban debajo de las ramas de la planta (Figura 14) (Santana *et al.* 2017).



*Figura 14.* Identificación y limpieza de las plantas de café. *Fuente:* Elaboración propia.

Para la aplicación del Carbofuran se definieron 3 tratamientos con las mismas concentraciones establecidas en la fase de laboratorio (T1= 0,4 ml/200 ml de agua destilada; T2= 0,8 ml/200 ml de agua destilada y T3= 1,2 ml/200 ml de agua destilada), más 3 repeticiones y un testigo por cada tratamiento. Posteriormente, se aplicó a 12 plantas diferentes con cada una de las dosis según corresponda (Figura 15).



*Figura 15.* Aplicación de las dosis de Carbofuran. *Fuente:* Elaboración propia.

#### **b. Recojo de las muestras de suelo y aplicación en las placas Petri**

Después de 24 horas de haberse aplicado la solución de Carbofuran a cada planta, se colocaron las muestras (12 muestras) georreferenciadas en bolsas plásticas herméticas con su respectiva codificación (Tabla 3); posteriormente fueron transportadas al Laboratorio General de Ciencias Básicas II de la Universidad Católica Sedes Sapientiae filial Rioja. Luego de ser esterilizadas a 180 °C por 2 horas, se agregó gránulos de suelo a una distancia de 1 cm entre cada uno, a 12 placas Petri que contenían Agar Ashby-Manitol y colonias de bacterias *Azotobacter* (Figura 16) (Flores *et al.*, 2017).



Tabla 3  
Ubicación de los tratamientos

Tratamientos	Coordenadas UTM WGS84	
	Este	Norte
M1_0	240192	9366356
M1_01	240184	9366333
M1_02	240185	9366340
M1_03	240186	9366353
M2_0	240246	9366346
M2_01	240240	9366339
M2_02	240237	9366357
M2_03	240233	9366366
M3_0	240308	9366424
M3_01	240312	9366393
M3_02	240313	9366391
M3_03	240302	9366416

Fuente: Elaboración propia



Figura 16. Aplicación de gránulos de suelo. Fuente: Elaboración propia.



Posteriormente, las placas Petri se incubaron durante siete días a una temperatura de 32 °C donde se pudo observar que los gránulos de suelo cafetalero con Carbofuran habían causado efectos a las colonias bacterianas (Figura 17).

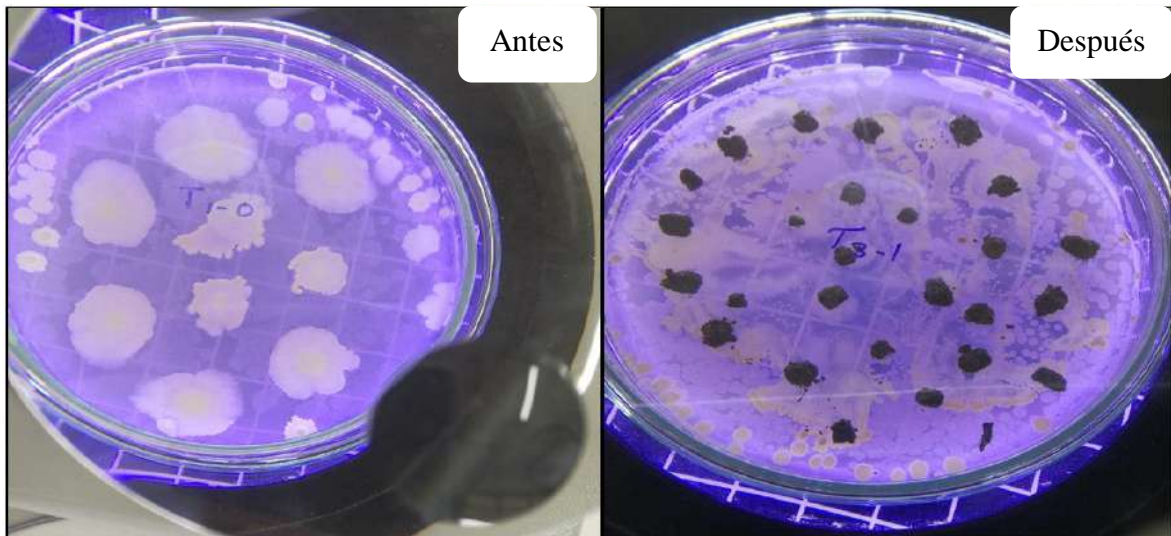


Figura 17. Conteo de colonias. Fuente: Elaboración propia.

Después de 15 días, nuevamente se extrajeron muestras de suelo de la finca y fueron sometidas a evaluación; para dicho estudio se preparó 12 placas Petri con Agar Ashby-Manitol, se realizó el agregado de gránulos a 1 cm de distancia entre cada uno, los cuales fueron incubados durante 7 días para las respectivas evaluaciones (Figura 18).

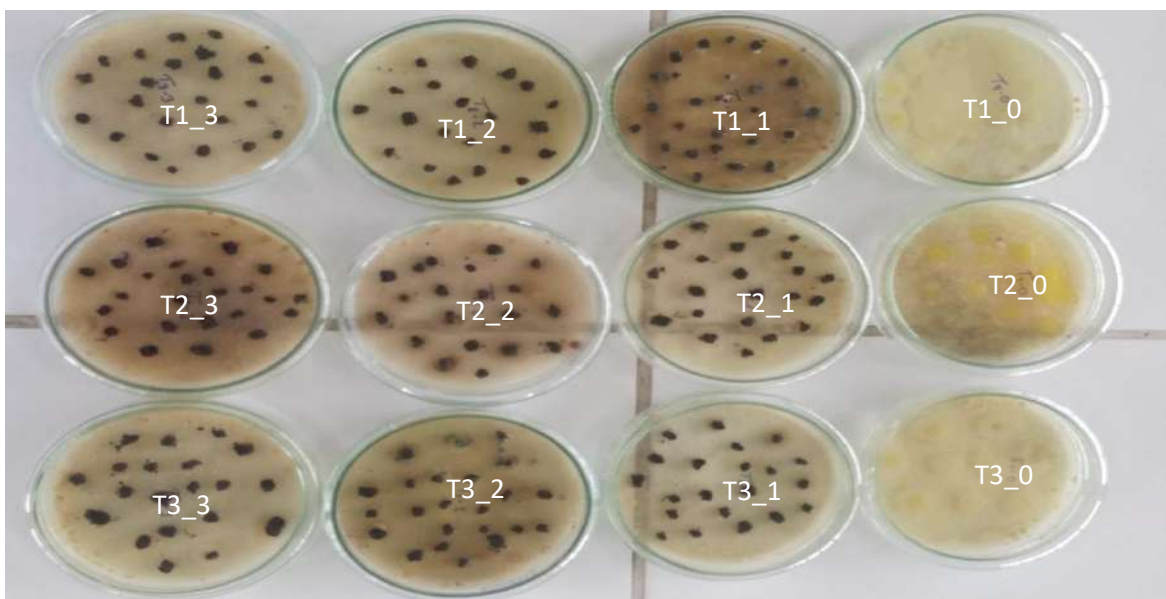


Figura 18. Efecto del Carbofuran después de los siete días de evaluación. Fuente: Elaboración propia.

### c. Medición de (pH) de las muestras de suelo

Para realizar el cálculo de (pH) se colocó en un vaso precipitado esterilizado al suelo cernido; posteriormente, se agregó agua destilada en proporción 1:1 p/v (Figura 19), se mezcló con el suelo hasta obtener una solución homogénea y se dejó reposar durante 5 minutos. Siguiendo el protocolo establecido por Jiménez (2007) (ver Apéndice 9), con la ayuda de un medidor multiparámetro marca HANNA, modelo HI9811-5, se midió el pH a cada muestra sometida a investigación (Figura 20).



*Figura 19.* Preparación del suelo con agua destilada en proporción 1/1 p/v. *Fuente:* Elaboración propia.



*Figura 20.* Medición de pH con el multiparámetro HI9811-5. *Fuente:* Elaboración propia.

## **FASE DE GABINETE**

Los datos numéricos obtenidos en la parte experimental fueron tabulados en el programa Excel, para poder realizar los estudios y comparaciones que permitieron llegar a los resultados deseados del estudio.

### **2.1.4. Tratamientos**

Se realizó tres tratamientos y un testigo sin Carbofuran por tratamiento (Tabla 4), en total se tuvo 12 contenedores de muestras en invernadero y 12 contenedores de muestras de campo, por cada periodo de tiempo. Cada contenedor tuvo 500 g de suelo y la dosis de Carbofuran por tratamiento.

Tabla 4  
Tratamientos experimentales y sus respectivas dosis

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de Carbofuran</b>
T0	Testigo sin Carbofuran
T1	0,4 ml de Carbofuran/200 ml de agua destilada
T2	0,8 ml de Carbofuran/200 ml de agua destilada
T3	1,2 g de Carbofuran/200 ml de agua destilada

*Fuente:* Elaboración propia.

### **2.1.5. Unidades experimentales**

Para el estudio se realizó 3 tratamientos, más 3 repeticiones y un testigo por cada tratamiento, teniendo 12 unidades experimentales para las pruebas en fase de laboratorio y 12 para las pruebas en fase de campo, los cuales estuvieron agrupados en bloques (Tabla 5). Las muestras de suelo con dosis de Carbofuran permanecieron en el invernadero durante todo el proceso de evaluación, donde se colocaron gránulos de suelo con Carbofuran en las placas y se realizó el conteo de colonias.

Tabla 5  
Distribución de tratamientos para muestras de invernadero y campo

Repeticiones	Dosis de Carbofuran (ml)			
	AT0	0,4	0,8	1,2
1	AT <sub>01</sub>	AT <sub>11</sub>	AT <sub>21</sub>	AT <sub>31</sub>
2	AT <sub>02</sub>	AT <sub>12</sub>	AT <sub>22</sub>	AT <sub>32</sub>
3	AT <sub>03</sub>	AT <sub>13</sub>	AT <sub>23</sub>	AT <sub>33</sub>

Fuente: Elaboración propia.

### 2.1.6. Identificación de las variables y su mensuración

Las variables de investigación y mensuración fueron: V1 las dosis fueron medidas en mililitros (0,4; 0,8 y 1,2 g de Carbofuran) y número de días (1 y 15 días respectivamente), por lo tanto; la V2 en número de colonias muertas (Tabla 6).

Tabla 6  
Variables de investigación y mensuración

Variables	Indicador	Mensuración
V1: Dosis.	0,4; 0,8 y 1,2 ml	MI
V2: Efecto	Tiempo	Días
	Muerte	Nº de colonias

Fuente: Elaboración propia.

### 2.1.7. Diseño estadístico del experimento

Para la fase de laboratorio se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) de un factor único, con tres tratamientos y tres repeticiones cada una, con la aplicación de diferentes dosis de Carbofuran. En la etapa de campo, el diseño experimental fue un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con 3 tratamientos y 3 repeticiones.

### **2.1.8. Análisis estadístico de datos**

Se realizó el estudio estadístico de los tratamientos utilizando el análisis de varianza (ANOVA) al 5 % de confianza, prueba de normalidad (Shapiro – Wilk), prueba de homogeneidad (Levene) mediante el paquete estadístico RStudio, versión 3.4.2 y comparaciones múltiples de Tukey (*Post hoc*).

## **2.2. Materiales**

### **2.2.1. Medio de cultivo y material biológico**

- Agar Ashby-Manitol
- Bacteria *Azotobacter* spp.

### **2.2.2. Reactivos**

Los reactivos que se utilizaron en la investigación son:

- Lugol parasitológico
- Cristal violeta  $C_{24}H_{28}N_3Cl$  con una densidad de  $0,24 \text{ g/cm}^3$
- Safranina  $C_{20}H_{19}ClN_4$  densidad de  $1,0 \text{ g/cm}^3$
- Aceite de inmersión  $C_{14}H_{12}O_2$  con densidad de  $1,02 \text{ g/cm}^2$
- Azul de metileno  $C_{16}H_{18}ClN_3S$  con densidad de  $1,757 \text{ g/cm}^3$
- Farmadan  $C_{12}H_{15}NO_3$
- Decolorante Gram  $C_3H_6O$  y  $CH_3OH$  con densidad de  $0,79 \text{ g/cm}^3$ .

### **2.2.3. Equipos de laboratorio**

Los equipos de laboratorio utilizados son los que a continuación se mencionan:

- Contador de colonias marca J-2 Colony Counter
- Balanza de 600 g
- pH metro marca HANNA HI9811-5
- Incubadora
- Cocina eléctrica

- Autoclave
- Horno Pasteur
- Refrigerador
- Microscopio compuesto
- Invernadero
- Tubos de ensayo
- Algodón hidrófilo
- Papel aluminio
- Pinza
- Luna de reloj
- Agua destilada
- Alcohol
- Pipeta de 10 ml
- Probeta de 500 ml
- Matraces de 250, 500 y 100 ml
- Asa de siembra
- Placas Petri
- Mecheros
- Espátula metálica
- Vaso precipitado de 100 ml

#### **2.2.4. Equipos de protección**

- Mascarilla quirúrgica
- Guantes de latex
- Protector facial
- Guardapolvo blanco

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

### 3.1. Caracterización físico - química del suelo

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos del análisis de parámetros generales de las muestras de suelo, realizado en el Laboratorio de Suelos del Proyecto Especial Alto Mayo (PEAM), Nueva Cajamarca, teniendo como resultados la clase textural del suelo con una predominancia de franco a franco arcilloso, con un pH base (mayor a 7); conductividad eléctrica no salino ( 0 – 2 mS/cm), nivel de materia orgánica media (2-3 %), nivel de nitrógeno medio (0,15 – 0,25 ug/m<sup>3</sup>), nivel de fósforo entre bajo y medio (>12, 12 – 24 mg/kg), nivel de potasio bajo (> 125 meq/100 g) y una capacidad de intercambio catiónico de 15 a 30 meq/100 g (ver Apéndice 3, 4, 5, 6 y 7).

Tabla 7  
Resultado del análisis físico-químico del suelo

Muestra	Clase textural	pH	CE (ds/m)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	CIC
T1	Franco	7,42	0,00158	2,682	0,121	9,660	80,700	12,660
T2	Franco	8,27	0,00164	2,590	0,116	10,700	86,400	11,860
T3	Franco	7,40	0,00062	2,840	0,128	18,200	106,100	13,280
T4	Franco Arcilloso	8,66	0,00119	2,480	0,112	7,600	89,400	14,610

Fuente: Laboratorio de suelos PEAM – Nueva Cajamarca.

### 3.2. Evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran en condiciones de laboratorio

Para determinar el comportamiento de las bacterias *Azotobacter* spp en condiciones de laboratorio, se realizaron las siguientes evaluaciones.

#### ➤ Determinación del pH de las muestras de suelo

La Tabla 8 muestra los resultados del pH obtenido en las muestras de suelo con Carbofuran, utilizadas en la fase de laboratorio. El tratamiento testigo presentó un promedio de pH 7, encontrándose en una clasificación de pH neutro. Los tratamientos T1, T2 presentaron un pH medianamente básico (7,4 y 7,5) y el T3 presentó un pH más neutro que alcalino (7,3).

Tabla 8

Datos de pH de las muestras de suelo con Carbofuran – fase de laboratorio

pH de las muestras de suelo – Fase de laboratorio			
T0	T1	T2	T3
7	7,1	7,4	7,2
6,9	7,5	7,5	7,4
7	7,5	7,5	7,3
7,0	7,4	7,5	7,3

Fuente: Elaboración propia.

#### ➤ Bioensayos de toxicidad utilizando *Azotobacter* spp.

La Tabla 9 presenta la cantidad de colonias vivas iniciales y muertas finales por acción de los gránulos de suelo contaminado en todos los tratamientos, después de 1 día de aplicación del Carbofuran, donde se puede visualizar que el testigo del tratamiento 1 y 2 presentó un incremento de colonias (15 y 18); en el testigo del tratamiento 3, murieron 3 colonias. En la repetición T3-2 hubo mayor incremento de muertes, con un total de 76 colonias muertas. La Tabla 10 muestra la cantidad de colonias vivas iniciales y muertas finales por acción de los gránulos de suelo contaminado en todos los tratamientos, después de 15 días de aplicación del Carbofuran, donde se visualiza, que solamente el testigo del tratamiento 1 presentó incremento de colonias (35). La repetición T2-3 presentó 517 colonias muertas, siendo el mayor número alcanzado en el día 15, en comparación con los demás tratamientos.



Tabla 9  
Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 1

Repetición	Día 1 (colonias iniciales vivas)				7 días después (colonias finales vivas)				Colonias muertas después de 7 días			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	17	100	44	52	32	38	2	3	-15	62	42	49
2	12	66	40	80	30	5	1	4	-18	61	39	76
3	7	34	58	62	4	4	3	2	3	30	55	60

*Nota. Los datos negativos representan un incremento de colonias (son tomados negativos por la ley de signos).  
Fuente: Elaboración propia.*

Tabla 10  
Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 15

Repetición	Día 15 (colonias iniciales vivas)				7 días después (colonias finales vivas)				Colonias muertas después de 7 días			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	143	220	240	187	178	48	19	40	-35	172	221	147
2	252	205	101	412	230	20	14	12	22	185	87	400
3	210	522	717	317	210	15	200	50	0	507	517	267

*Nota. Los datos negativos representan un incremento de colonias (son tomados negativos por la ley de signos).  
Fuente: Elaboración propia.*

### ➤ Estadísticos descriptivos para la variable muerte

En la Figura 21 se aprecia que no se presentaron muertes de colonias en el testigo (sin Carbofuran) en el día 1 hubo un incremento de 10 colonias y el día 15 hubo un incremento de 4 colonias; asimismo, también se observa que conforme la dosis de Carbofuran se incrementa por tratamiento (T1, T2 y T3) en el día 1 y 15, el número promedio de colonias muertas también aumenta. En lo que respecta al esparcimiento de los datos (barras de error), se aprecia menor dispersión de la media en el tratamiento 3 a los 15 días, en comparación a los otros tratamientos; mientras que, el tratamiento 2, en el día 1, presenta una menor dispersión. Además, se observa que en el día 1 de contacto, la bacteria sufre un declive en su viabilidad de forma significativa; mientras que, a los 15 días de contacto el número de colonias disminuye.

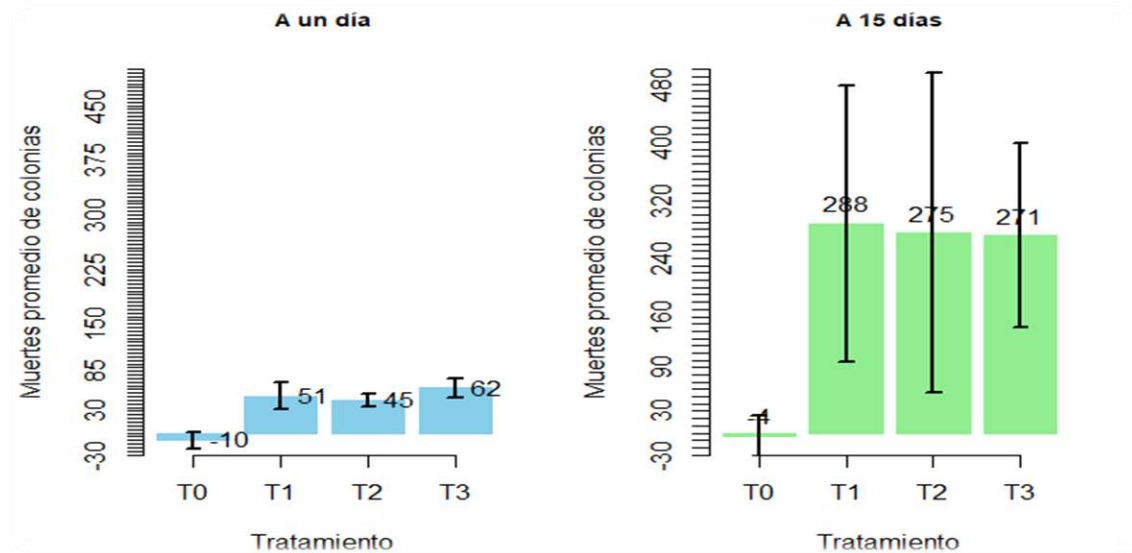


Figura 21. Promedio de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento – fase laboratorio. Fuente: Elaboración propia.

Nota: T0= Testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1=0,4 ml de Carbofuran; T2=0,8 ml de Carbofuran, T3=1,2 ml de Carbofuran

En la Figura 22 se presenta la dispersión de las muertes de colonias por tiempo de aplicación, según tratamiento. Se aprecia que en el testigo (T0), las muertes de colonias son inferiores frente a las tres diferentes dosis aplicadas en cada uno de los tratamientos. En todos los tratamientos (T1, T2 y T3), las muertes son inferiores en el día 1, en comparación con el día 15; esto debido a que mientras mayor sea el tiempo de permanencia del Carbofuran sobre las colonias, mayor será el efecto de muerte de las bacterias.

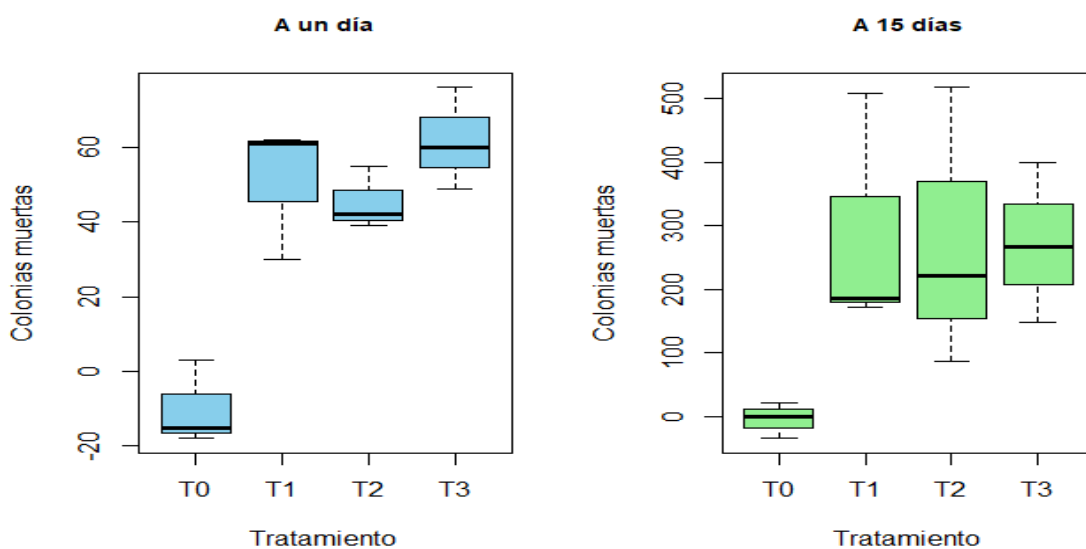


Figura 22. Box plot de la dispersión de colonias muertas por periodo según tratamiento – fase laboratorio. Fuente: Elaboración propia.

Nota: T0=testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1=0,4 ml de Carbofuran, T2=0,8 ml de Carbofuran, T3=1,2 ml de Carbofuran.

### ➤ **Análisis de Varianza Aditivo (ANOVA)**

La Tabla 11 presenta los resultados del contraste ANOVA aditivo que tiene como variable respuesta (dependiente) a la cantidad de colonias muertas según dosis aplicadas de Carbofuran por tratamiento en laboratorio (bloques), donde se concluye que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en al menos una de las dosis y entre fase de laboratorio. El efecto en la fase de laboratorio (bloque) es 40 % [0,07; 0,62], similar efecto tiene las diferentes dosis (tratamientos) que representan el 34 % [0,00; 0,53].

Tabla 11  
Análisis de varianza aditivo para la muerte de colonias

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	174 421,50	1	174 421,50	12,80	0,002	0,40	[0,07; 0,62]
Tratamiento	134 261,83	3	44 753,94	3,28	0,043	0,34	[0,00; 0,53]
Error	258 909,17	19	13 626,80				

Fuente: Elaboración propia.

### ➤ **Análisis de Varianza Multiplicativo (ANOVA)**

En la Tabla 12, se tiene los resultados del ANOVA multiplicativo; es decir, que la interacción entre periodo en laboratorio (bloque) y las dosis (tratamientos) de Carbofuran no tienen un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre las muertes de colonias; lo mismo sucede con el periodo en laboratorio (bloque) que no tiene un efecto sobre las muertes de colonias. Sin embargo, al menos una de las dosis, sí presenta una significancia ( $p < 0,05$ ) sobre las muertes de colonias. En este modelo con interacción, se tiene un efecto igual a 50 % [0,04; 0,65] de las diferentes dosis, sobre las muertes de colonias.

Para el análisis de la investigación se ha considerado el modelo aditivo, porque posee efecto significativo en el periodo de laboratorio (bloques) y las diferentes dosis (tratamientos), sobre las muertes de colonias. En cambio, en el modelo multiplicativo, la interacción anula el efecto de los bloques, además, la misma interacción no tienen un efecto significativo sobre las muertes de las colonias.

Tabla 12  
Análisis de varianza multiplicativo para la muerte de colonias

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	6 767,04	1	6 767,04	3,74	0,071	0,19	[0,11; 0,70]
Tratamiento	29 086,12	3	9 695,37	5,36	0,010	0,50	[0,05; 0,66]
Bloque x Tratamiento	3 476,46	3	1 158,82	0,64	0,600	0,11	[0,00; 0,29]
Error	28 938,00	16	1 808,62				

Fuente: Elaboración propia.

### ➤ Comparaciones múltiples – Pruebas post hoc (Tukey)

En la Tabla 13 y Figura 23, se muestra el resultado de las comparaciones múltiples del modelo aditivo. Este análisis fue realizado porque existió un efecto significativo en las dosis aplicadas a base de Carbofuran (T0, T1, T2 y T3). Se concluye que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) entre las muertes promedio de colonias según periodo en laboratorio (bloques).

Tabla 13  
Comparaciones del ANOVA aditivo sobre la muerte de colonias

Fuente	Diferencia de medias	Límite inferior	Límite superior	Significancia
<b>Bloque</b>				
L2-L1	170,5	70,754	270,246	0,0020078
<b>Tratamiento</b>				
T1-T0	176,666667	-12,84145	366,1748	0,0729460
T2-T0	167,333333	-22,17479	356,8415	0,0951341
T3-T0	173,666667	-15,84145	363,1748	0,0795163
T2-T1	-9,333333	-198,84145	180,1748	0,9990172
T3-T1	-3,000000	-192,50812	186,5081	0,9999671
T3-T2	6,333333	-183,17479	195,8415	0,9996915

Nota: La prueba de comparaciones múltiples compara la diferencia promedio de dos grupos. Considerando un nivel de significancia del 5 %, dicha significancia es significativa, cuando  $p_{adj}$  es menor que 0,05.

Fuente: Elaboración propia.

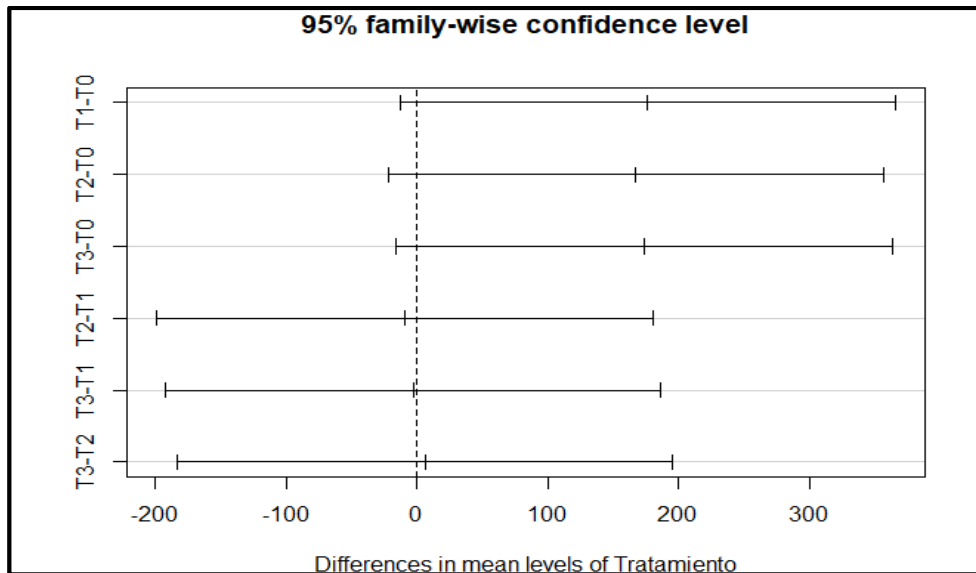


Figura 23. Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos (dosis) a base de Carbofuran sobre las muertes de colonias en laboratorio. Fuente: Elaboración propia.

➤ **Prueba de normalidad (Shapiro Wilk)**

La Figura 24, muestra los residuos del modelo ANOVA aditivo que están alrededor de la línea continua, la cual representa la normalidad; también se aprecia que un residuo está fuera de las bandas de confianza (líneas discontinuas). Además, a través de la prueba de Shapiro-Wilk se confirma que los residuos se aproximan a una distribución normal ( $p > 0,05$ ). Supuesto que se requiere para la validez del ANOVA que se está utilizando.

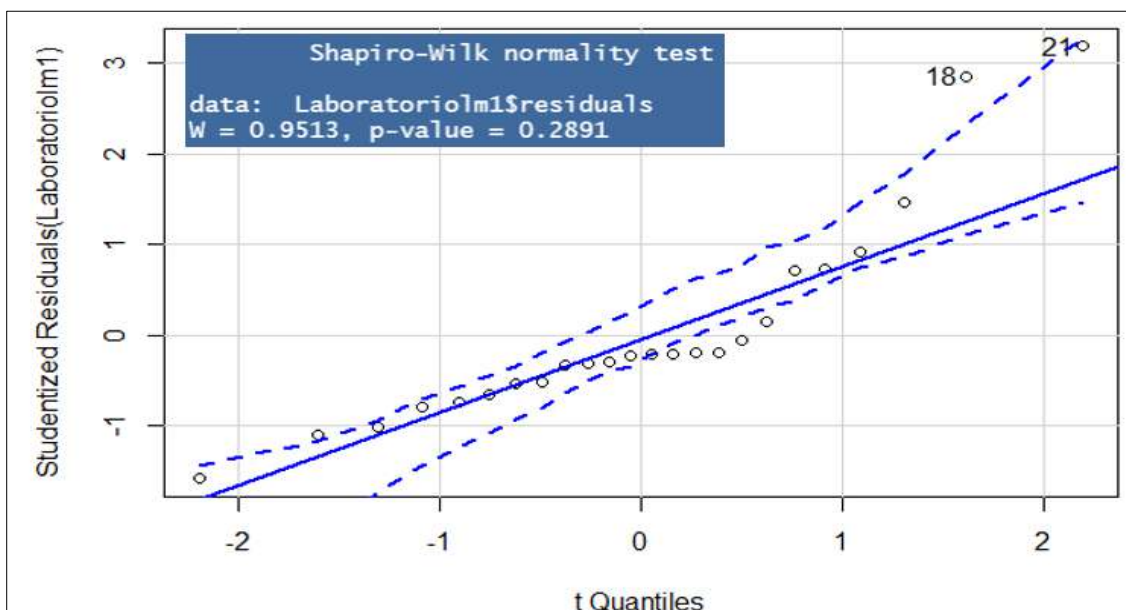


Figura 24. Representación gráfica de cuantiles teóricos frente a los residuos del modelo ANOVA aditivo en laboratorio. Fuente: Elaboración propia.  
Nota: t quantiles, representan a los cuantiles teóricos de la distribución normal estándar.

➤ **Prueba de homogeneidad de varianza (Levene)**

En la Tabla 14, el supuesto de homogeneidad de varianzas también se cumple ( $p > 0,05$ ), así como el supuesto de normalidad. Esto indica que los resultados y las conclusiones acerca de los tratamientos (dosis) de Carbofuran son válidos y se ajustan al rigor estadístico para su extrapolación.

Tabla 14  
Prueba de homogeneidad de varianzas sobre la muerte de colonias por tratamiento

<b>Prueba de Levene para la Homogeneidad de Varianza (centro = media)</b>		
Df	F valor	Pr(>F)
Grupo 3	1,353	0,2857

Nota: Df= grados de libertad. Fuente: Elaboración propia.

**3.3. Comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran aplicado al suelo en tres periodos en condiciones de campo**

Para determinar el comportamiento de las bacterias *Azotobacter* spp. en condiciones de laboratorio, se realizaron las siguientes evaluaciones.

➤ **Determinación del pH de las muestras de suelo**

La Tabla 15 muestra los resultados el pH obtenido en las muestras de suelo utilizadas en la fase de campo. El tratamiento testigo presentó un promedio de pH 6,6; los tratamientos T1, T2 y T3 se encontraron dentro del rango de pH neutro (6,8 y 6,9).

Tabla 15  
 Datos de pH de las muestras de suelo con Carbofuran – fase de campo

<b>Campo</b>			
<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
7	6,7	6,8	6,8
6	7	6,6	6,9
6,7	6,8	6,9	6,9
6,6	6,8	6,8	6,9

Fuente: Elaboración propia.

➤ **Bioensayos de toxicidad utilizando *Azotobacter* spp.**

La Tabla 16 presenta la cantidad de colonias vivas iniciales y muertas finales por acción de los gránulos de suelo contaminado en todos los tratamientos, después de 1 día de aplicación del Carbofuran donde se puede visualizar que en el testigo del tratamiento 1 y 3, solamente murió una colonia por cada una; a diferencia del testigo del tratamiento 2, donde hubo un incremento de 3 colonias; asimismo, en la repetición T2-2 hubo mayor incremento de muertes, teniendo un total de 105 colonias muertas en el día 1. La Tabla 17 presenta la cantidad de colonias vivas iniciales y muertas finales por acción de los gránulos de suelo contaminado, después de 15 días de aplicación del Carbofuran, donde se puede observar que el testigo del tratamiento 1 y 3, presentaron 1 colonia más cada una; sin embargo, el testigo del tratamiento 2, presentó 2 colonias más; finalmente, la repetición T3-1 mostro un mayor efecto con 190 colonias muertas a los 15 días, siendo el mayor número de muertes en comparación con los demás tratamientos.

Tabla 16  
 Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 1

<b>Repetición</b>	<b>Día 1 (colonias iniciales vivas)</b>				<b>7 días después (colonias finales vivas)</b>				<b>Colonias muertas después de 7 días</b>			
	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
<b>1</b>	71	104	62	45	70	15	39	12	1	89	23	33
<b>2</b>	60	66	112	60	63	14	7	6	-3	52	105	54
<b>3</b>	35	61	88	40	34	8	9	13	1	53	79	27

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 17  
 Número de colonias bacterianas vivas y muertas según tratamiento día 15

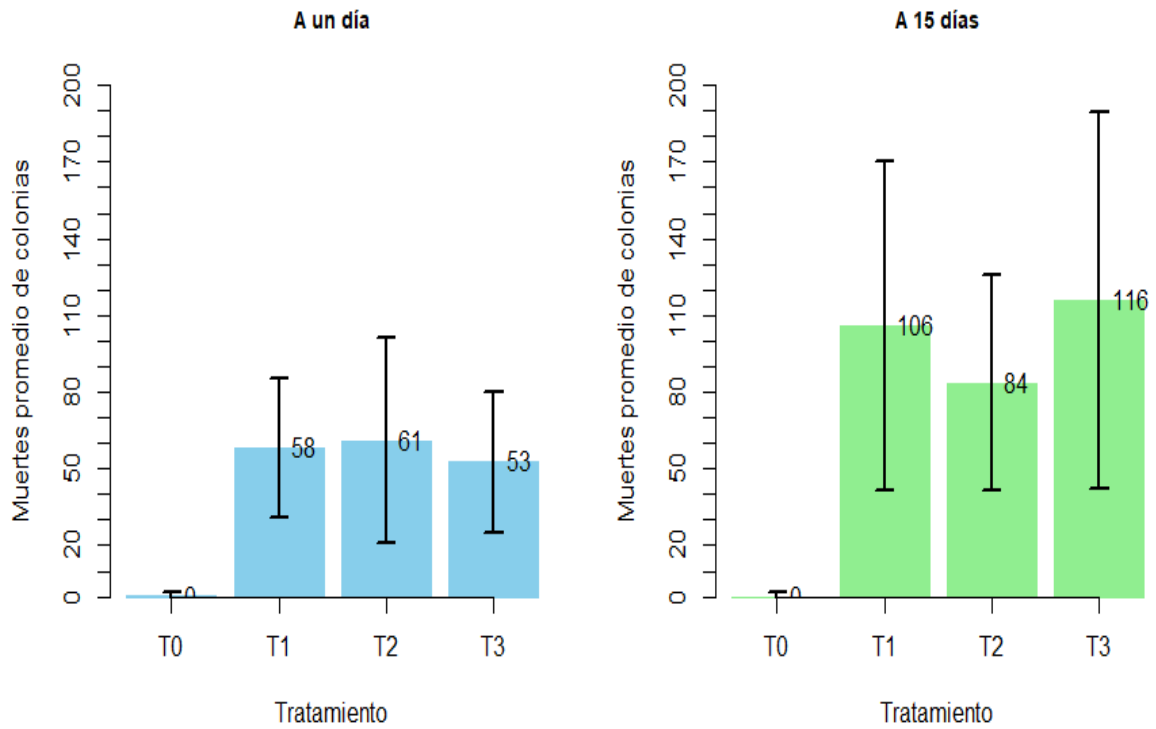
Repetición	Día 15 (colonias iniciales vivas)				7 días después (colonias finales vivas)				Colonias muertas después de 7 días			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
1	89	81	148	193	88	18	17	3	1	63	131	190
2	82	80	82	122	84	5	11	7	-2	75	71	115
3	49	240	65	62	48	60	16	19	1	180	49	43

Fuente: Elaboración propia.

### ➤ Estadísticos descriptivos para la variable muerte

En la Figura 25, se aprecia que en el día 1 al igual que en el día 15 el número promedio de colonias muertas en el testigo (sin Carbofuran) se encuentra en cero. En el día 1, conforme la dosis de Carbofuran se incrementa en cada tratamiento, el número promedio de colonias muertas también aumenta, a excepción del tratamiento 3; por otro lado, en el día 15 se tiene el mismo comportamiento en todos los tratamientos, con excepción del tratamiento 2, donde el número de bacterias muestras disminuye. En lo que concierne a la dispersión de los datos (barras de error), respecto a la media en el día 1, se aprecia menor dispersión en los tratamientos 1 y 3, en comparación en tratamiento 2; asimismo, la dispersión de los datos en el día 15 muestra que existe una menor dispersión el tratamiento 2, en comparación con los tratamientos 1 y 3. Estos resultados se deben a que, con el pasar el tiempo las bacterias *Azotobacter* no tienen condiciones de tolerancia frente a las diferentes concentraciones de Carbofuran en el medio.





**Figura 25.** Promedio de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento – fase de campo. *Fuente:* Elaboración propia.

*Nota:* T0=testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1=0,4 ml de Carbofuran, T2=0,8 ml de Carbofuran, T3=1,2 ml de Carbofuran.

En la Figura 26, se observa la dispersión de las muertes de colonias por tiempo de aplicación según tratamiento. En el testigo (T0), las muertes de colonias son inferiores frente a las tres diferentes dosis aplicadas en cada uno de los dos tiempos (día 1 y día 15). En el día 1 y tratamiento 1, las muertes son inferiores al mismo tratamiento en el día 15. Respecto al tratamiento 3, en el día 15, las muertes son superiores a los demás tratamientos, tanto en el día 1 y del día 15; esto debido a que, en el transcurso de los días las bacterias se tornan susceptibles al contacto de Carbofuran en las diferentes dosis aplicadas en campo, observándose mayor efecto a través del tiempo.

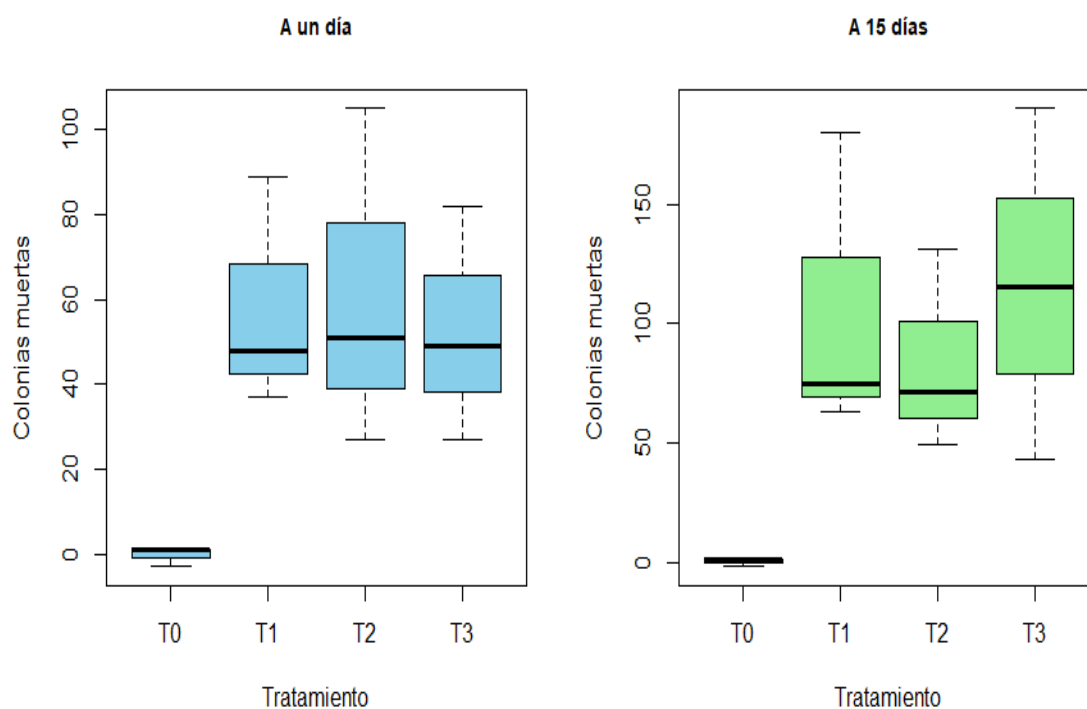


Figura 26. Box plot de la dispersión de colonias muertas por periodo de tiempo según tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Nota: T0= testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1= 0,4 ml de Carbofuran, T2=0,8 ml de Carbofuran, T3= 1,2 g de Carbofuran.

### ➤ Análisis de Varianza Aditivo (ANOVA)

El Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) considera dos modelos: aditivo y multiplicativo (interacción). En la Tabla 18, se presenta el modelo aditivo donde se ha considerado a las muertes de colonias como variable respuesta (dependiente) en dos periodos (días) aplicado como bloque y a las diferentes dosis (tratamiento) a base de Carbofuran como variables predictoras (independientes). El resultado de los bloques no mostró un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) en las muertes de las colonias; sin embargo, las diferentes dosis (tratamientos) sí presentaron un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) y al menos una difiere de las otras. Respecto a la aplicación de las diferentes dosis se tiene un efecto del 47 % [0,06; 0,63] sobre las muertes de colonias.

Tabla 18  
Análisis de varianza aditivo para la muerte de colonias

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	6 767,04	1	6 767,04	3,97	0,061	0,17	[0,00; 0,44]
Tratamiento	29 086,12	3	9 695,37	5,68	0,006	0,47	[0,06; 0,63]
Error	32 414,46	19	1 706,02				

Fuente: Elaboración propia.

### ➤ Análisis de Varianza Multiplicativo (ANOVA)

El modelo multiplicativo del DBCA, considera a la interacción entre los bloques y los tratamientos sobre el efecto de la variable respuesta. En la Tabla 19 se aprecia que la interacción entre el periodo (bloque) y las dosis (tratamientos) de Carbofuran, no presentaron un efecto significativo ( $p > 0,05$ ) sobre las muertes de colonias; lo mismo sucede con el periodo (bloque) sobre las muertes de colonias. Sin embargo, al menos una de las dosis sí tuvo una significancia ( $p < 0,05$ ) sobre las muertes de colonias. En este modelo con interacción de la aplicación de diferentes dosis, se tiene un efecto igual al 50 % [0,05; 0,66] sobre las muertes de colonias. Para el análisis de la investigación se ha considerado el modelo aditivo, porque no existe significancia estadística en la interacción entre periodo y tratamiento.

Tabla 19  
Análisis de varianza multiplicativo para muerte de colonias

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	6 767,04	1	6 767,04	3,74	0,071	0,19	[0,00; 0,47]
Tratamiento	29 086,12	3	9 695,37	5,36	0,010	0,50	[0,05; 0,66]
Bloque x Tratamiento	3 476,46	3	1 158,82	0,64	0,600	0,11	[0,00; 0,29]
Error	28 938,00	16	1 808,62				

Fuente: Elaboración propia.

➤ **Comparaciones múltiples – Pruebas post hoc (Tukey)**

En la Tabla 20 y Figura 27 se muestra los resultados de las comparaciones múltiples del modelo aditivo, donde muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos T1, T2 y T3, con el testigo (T0), lo que indica que, con las diferentes dosis frente al tratamiento, mueren menos colonias. Este análisis se ha realizado porque existe significancia estadística del efecto de las dosis a base de Carbofuran sobre las muertes de las colonias.

Tabla 20  
Comparaciones múltiples por tratamiento sobre la muerte de colonias

Tratamiento	Diferencia de medias	Límite inferior	Límite superior	Significancia
T1-T0	82,166667	15,112852	149,22048	0,0132111
T2-T0	72,500000	5,446185	139,55381	0,0313005
T3-T0	84,500000	17,446185	151,55381	0,0106812
T2-T1	-9,666667	-76,720481	57,38715	0,9768381
T2-T1	2,333333	-64,720481	69,38715	0,9996519
T3-T2	12,000000	-55,053815	79,05381	0,9573217

*Nota:* La prueba de comparaciones múltiples compara la diferencia promedio de dos grupos. Considerando un nivel de significancia del 5 %, dicha significancia es significativa, cuando  $p_{adj}$  es menor que 0,05.

*Fuente:* Elaboración propia.

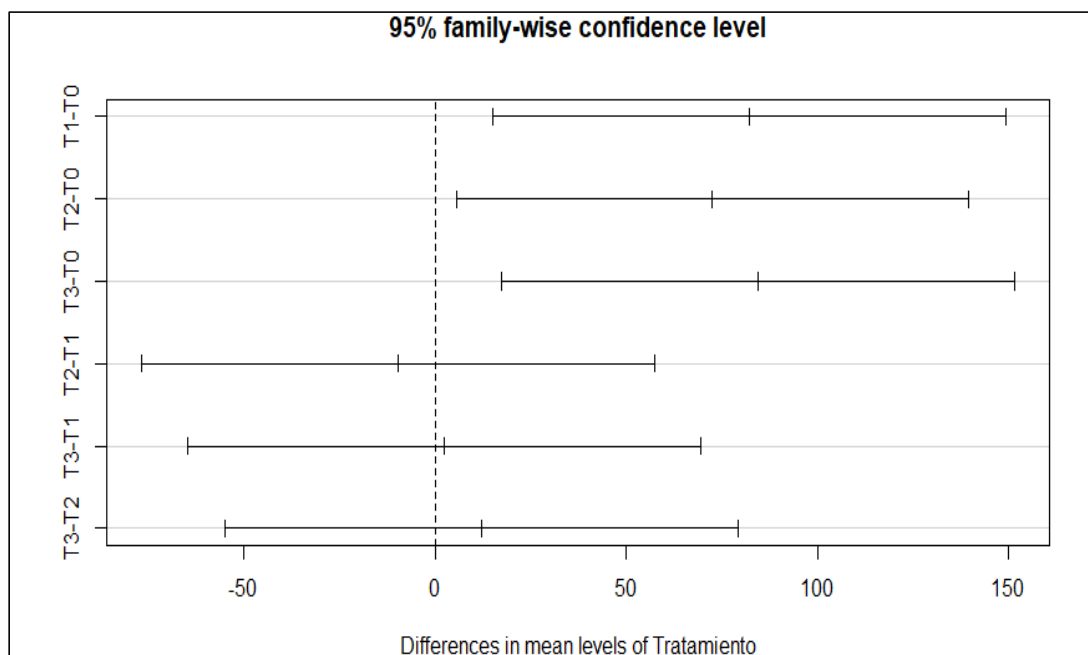


Figura 27. Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos a base de Carbofuran sobre la muerte de colonias – fase de campo. *Fuente:* Elaboración propia.

Para que las conclusiones basadas en un modelo de diseño de experimentos sean válidas, se requiere que los residuos de dicho modelo cumplan ciertos supuestos, tales como: normalidad y homogeneidad de varianzas. A continuación, se analiza dichos supuestos.

➤ **Prueba de normalidad (Shapiro – Wilk)**

En la Figura 28 se aprecia que los residuos del modelo ANOVA aditivo están alrededor de la línea continua, la cual representa la normalidad; asimismo, se observa que ningún residuo está fuera de las bandas de confianza (líneas discontinuas). Además, a través de la prueba de Shapiro-Wilk se confirma que los residuos se aproximan a una distribución normal ( $p > 0,05$ ), supuesto que se requiere para la validez del ANOVA que se está utilizando.

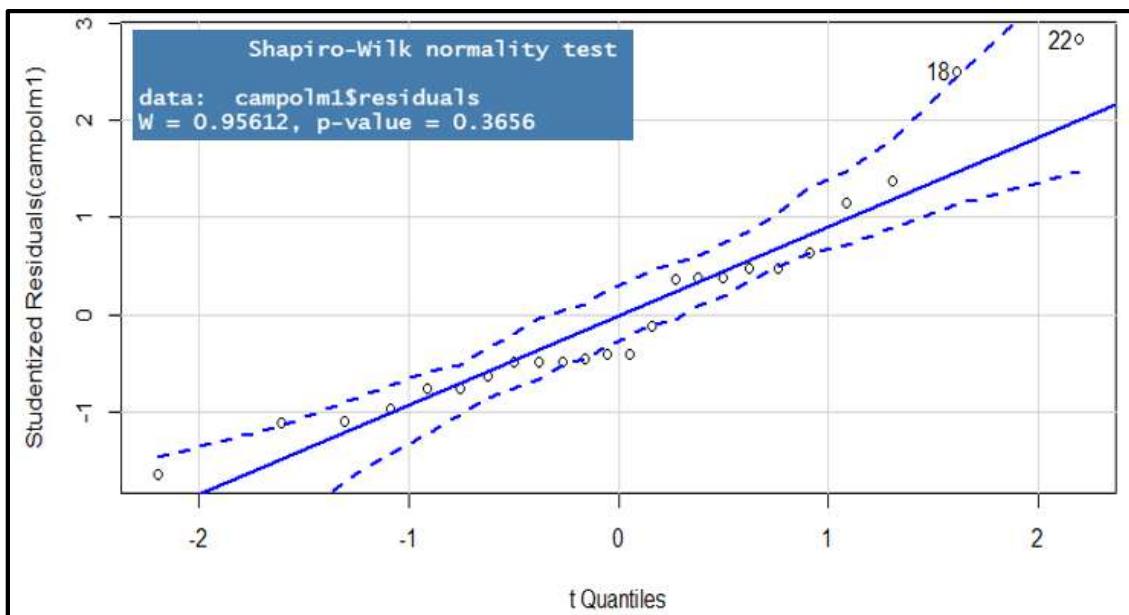


Figura 28. Cuartiles teóricos frente a los residuos del ANOVA aditivo – fase de campo.

Fuente: Elaboración propia.

Nota: *t* quantiles, representan a los cuartiles teóricos de la distribución normal estándar.

➤ **Prueba de homogeneidad de varianza (Levene)**

En la Tabla 21 el supuesto de homogeneidad de varianzas también se cumple ( $p > 0,05$ ), así como el supuesto de normalidad. Esto indica, que los resultados y las conclusiones acerca de los tratamientos (dosis) de Carbofuran son válidos y se ajustan al rigor estadístico para su extrapolación.

Tabla 21  
Homogeneidad de varianzas sobre la muerte de colonias según tratamiento

<b>Prueba de Levene para la Homogeneidad de Varianza (centro = media)</b>			
	Df	F value	Pr(>F)
Grupo	3	1,2527	0,3173

Nota: Df= grados de libertad. Fuente: Elaboración propia.

### **3.4. Evaluación comparativa del comportamiento de *Azotobacter* spp. en condiciones de laboratorio y campo**

Se realizaron comparaciones entre los datos obtenidos de las evaluaciones realizadas en laboratorio y campo, donde los resultados obtenidos se detallan a continuación:

#### ➤ **Comparativo de los estadísticos descriptivos para la variable muerte**

En la Figura 29 se observa que, en la prueba de campo, en el tratamiento testigo (T0) el número promedio de colonias muertas es menor al mismo tratamiento en la prueba de laboratorio; también se observa que, en ambas fases de la prueba, conforme la dosis de Carbofuran se incrementa, el número promedio de colonias muertas es mayor. En lo que concierne al esparcimiento de los datos (barras de error) con respecto a la media, en la prueba de laboratorio se aprecia mayor dispersión en el tratamiento T1 en comparación a los otros tratamientos, mientras que en la prueba de campo se aprecia mayor dispersión en el tratamiento testigo (T0). Asimismo, el número promedio de colonias muertas es mayor en la fase de laboratorio que en la de campo.

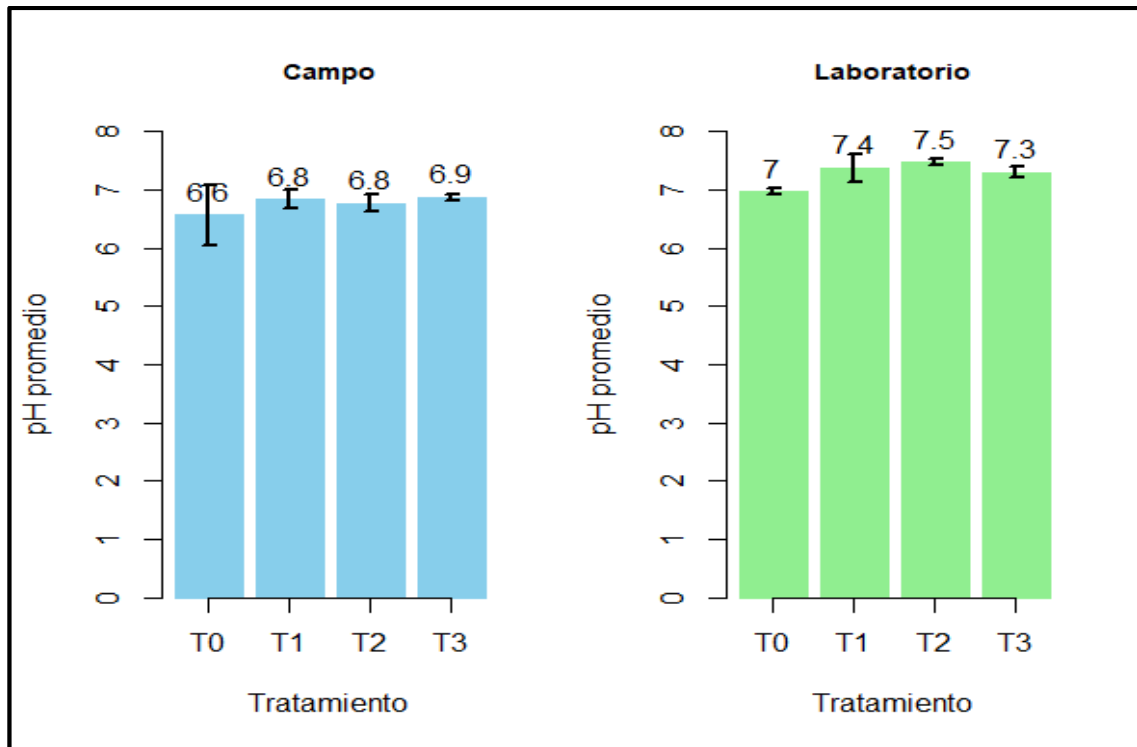


Figura 29. Promedio de colonias muertas por fase (campo y laboratorio) según tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Nota: T0=testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1=0,4 ml de Carbofuran, T2=0,8 ml de Carbofuran, T3=1,2 ml de Carbofuran

En la Figura 30 se presenta la dispersión de las muertes de colonias por fase de aplicación (laboratorio y campo) según tratamiento. Se aprecia que, en la prueba de campo, en el tratamiento testigo (T0) el número promedio de colonias muertas es menor al mismo tratamiento que en la prueba de laboratorio. Asimismo, en la prueba de campo, las muertes de bacterias del tratamiento 1, 2 y 3 son inferiores a los mismos tratamientos que en la prueba de laboratorio. Estos resultados se dan debido a que, cuanto más tiempo transcurre, el efecto de Carbofuran sobre las colonias es mayor y por lo tanto el número de colonias muertas también se incrementa.

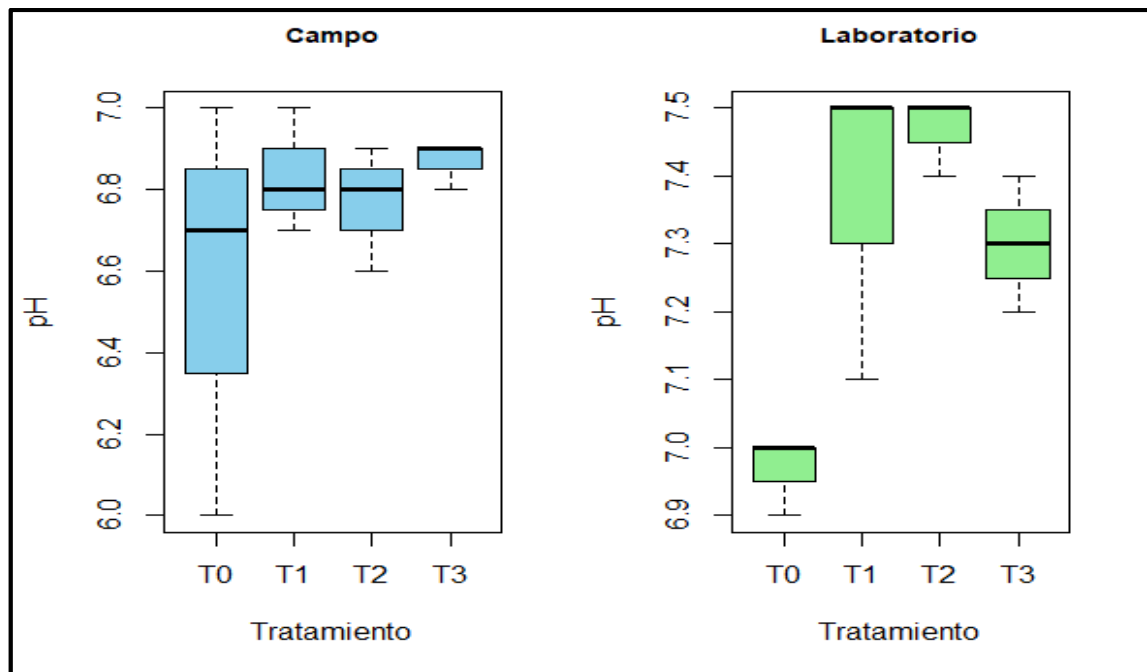


Figura 30. Box plot de la dispersión de colonias muertas por fase (campo y laboratorio) según tratamiento. Fuente: Elaboración propia.

Nota: T0=testigo de los tratamientos (sin Carbofuran), T1=0,4 ml de Carbofuran, T2=0,8 ml de Carbofuran, T3=1,2 ml de Carbofuran.

➤ **Análisis de Varianza Aditivo (ANOVA)**

En la Tabla 22 se presenta los datos del contraste ANOVA aditivo que tiene como variable respuesta (dependiente) al pH, según las dosis aplicadas de Carbofuran (tratamientos) y la fase (laboratorio y campo). Se concluye que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en al menos una de las dosis y entre la fase de aplicación. El efecto de las fases (bloques) donde se aplica, es 65 % [0,33; 0,78]; el efecto de las diferentes dosis (tratamientos) representan un efecto igual al 37 % [0,00; 0,55].

Tabla 22

Análisis de varianza aditivo para el pH como efecto del Carbofuran en campo y laboratorio

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	1,60	1	1,60	35,87	0,000	0,65	[0,33; 0,78]
Tratamiento	0,50	3	0,17	3,76	0,028	0,37	[0,00; 0,55]
Error	0,85	19	0,04				

Fuente: Elaboración propia.



➤ **Análisis de Varianza Multiplicativo (ANOVA)**

En la Tabla 23 se tiene los resultados del ANOVA multiplicativo; es decir, la interacción de las fases de aplicación (bloques) y las dosis (tratamientos) de Carbofuran, tienen un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el pH; lo mismo sucede en las fases de aplicación (bloque), donde tiene un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre el pH. En este modelo con interacción, el efecto sobre el pH de las fases (campo y laboratorio) es 66 % [0,30 y 0,79], de las diferentes dosis a base de Carbofuran es 3 % [0,00; 0,12] y de la interacción entre ambiente y dosis es 50 % [0,05; 0,66]. Para el análisis de la investigación se ha considerado el modelo aditivo, porque tiene efecto significativo tanto en las fases de aplicación (bloques) y las diferentes dosis (tratamientos) sobre el pH; además, el interés es analizar el efecto de las dosis de Carbofuran. En el modelo multiplicativo, la interacción anula el efecto de los tratamientos.

Tabla 23

Análisis de varianza multiplicativo para el pH como efecto del Carbofuran en campo y laboratorio

Fuente	Suma cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Valor de p	Tamaño del efecto ( $\eta^2$ )	[Límite inferior; Límite superior]
Bloque	50 784,00	1	50 784,00	30,68	0,000	0,66	[0,30; 0,79]
Tratamiento	862,00	3	287,33	0,17	0,913	0,03	[0,00; 0,12]
Bloque x Tratamiento	26 677,00	3	8 892,33	5,37	0,009	0,50	[0,05; 0,66]
Error	26 486,00	16	1 655,38				

Fuente: Elaboración propia.

➤ **Comparaciones múltiples – post hoc (Tukey)**

En la Tabla 24 y Figura 31 muestran que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) entre el pH promedio según campo y laboratorio (bloques). Se concluye que si existe una significancia ( $p < 0,05$ ) entre el pH promedio en el tratamiento 2 (T2) y el tratamiento testigo (T0).

Tabla 24  
Comparaciones del ANOVA aditivo sobre el pH

Fuente	Diferencia de medias	Límite inferior	Límite superior	Significancia
<b>Bloque</b>				
Laboratorio-Campo	0,5166667	0,3361135	0,6972198	9,2e-06
<b>Tratamiento</b>				
T1-T0	0,33333333	-0,009700829	0,6763675	0,0586301
T2-T0	0,35000000	0,006965838	0,6930342	0,0445399
T3-T0	0,31666667	-0,026367495	0,6597008	0,0766625
T2-T1	0,01666667	-0,326367495	0,3597008	0,9990562
T3-T1	-0,01666667	-0,359700829	0,3263675	0,9990562
T3-T2	-0,03333333	-0,376367495	0,3097008	0,9926301

Fuente: Elaboración propia.

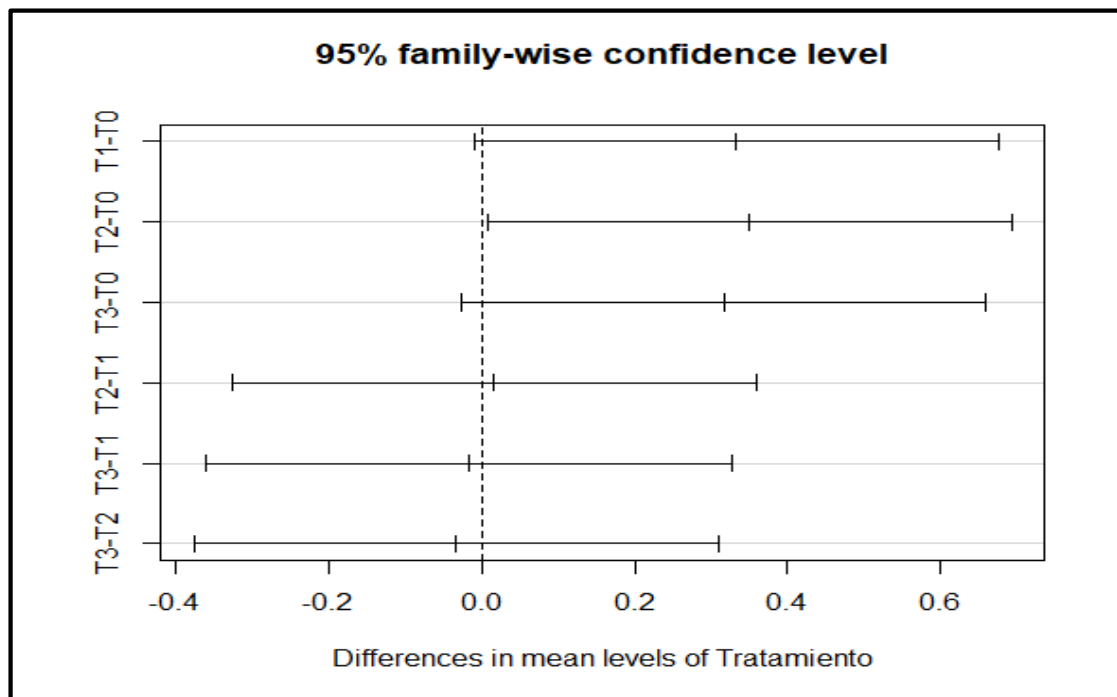


Figura 31. Intervalos de confianza de las diferencias entre tratamientos sobre la muerte de colonias bacterianas en campo y laboratorio. Fuente: Elaboración propia.

➤ **Prueba de normalidad (Shapiro wilk)**

En la Figura 32 se muestra que los residuos del modelo ANOVA aditivo están alrededor de la línea continua, la cual representa la normalidad; también se aprecia, que ningún residuo está fuera de las bandas de confianza (líneas discontinuas). Además, a través de la prueba de Shapiro-Wilk se confirma que los residuos de las evaluaciones, se aproximan a una

distribución normal ( $p > 0,05$ ); supuesto que se requiere para la validez del ANOVA que se está utilizando.

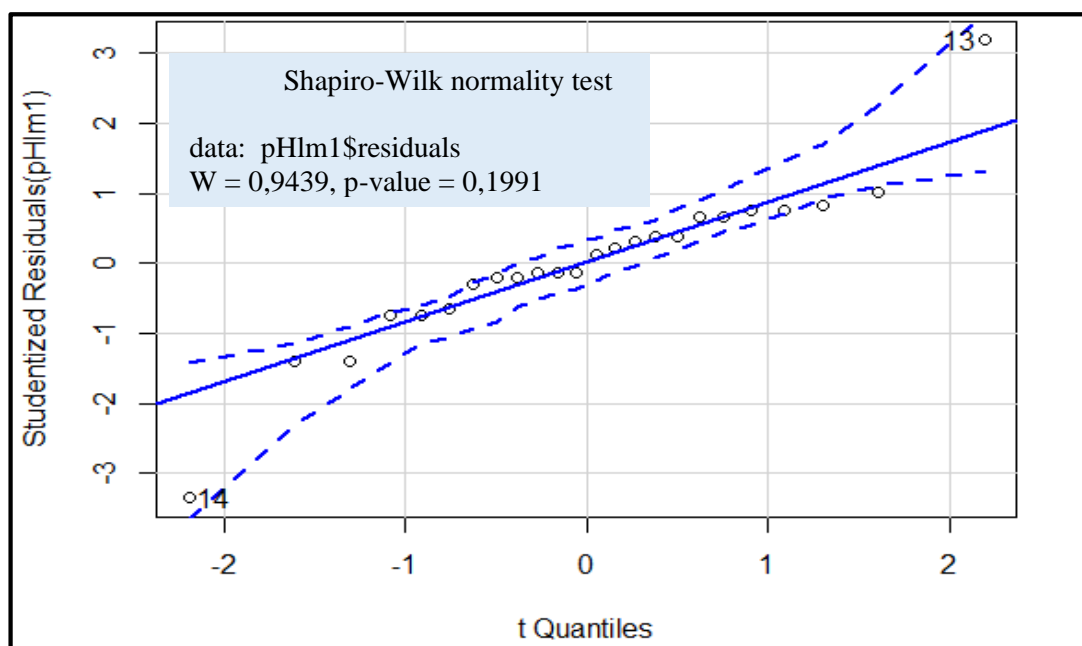


Figura 32. Cuartiles teóricos frente a los residuos del modelo ANOVA aditivo en campo y laboratorio. Fuente: Elaboración propia.

Nota:  $t$  cuantiles, representan a los cuartiles teóricos de la distribución normal estándar.

### ➤ Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene)

En la Tabla 25 el supuesto de homogeneidad de varianzas también se cumple ( $p > 0,05$ ), así como el supuesto de normalidad. Esto indica que los resultados y las conclusiones acerca de los tratamientos (dosis) de Carbofuran son válidos y se ajustan al rigor estadístico para su extrapolación.

Tabla 25

Homogeneidad de varianzas sobre pH según tratamiento en campo y laboratorio

Prueba de Levene para la homogeneidad de Varianza (centro = media)		
Df	F valor	Pr (>F)
Grupo 3	1,7862	0,1822

Nota: Df= grados de libertad. Fuente: Elaboración propia.

## CAPÍTULO IV: DISCUSIONES

### 4.1. Caracterización físico - química del suelo

Se realizaron los análisis físico-químicos a cada una de las muestras de suelo tomadas de la finca “El Huascarán”, con el objetivo de conocer determinados parámetros como la textura, pH, porcentaje de materia orgánica, etc., que afectan la movilidad y permanencia del Carbofuran en el suelo. Delgado y Fajardo (2015) establecieron que la textura del suelo es uno de los parámetros que afecta directamente la movilidad del Carbofuran, en específico los suelos franco arcillosos, debido a la presencia de minerales; es decir, a una mayor cantidad de arcilla, la adsorción de insecticida será mayor; en cuanto a la movilidad, no existe una relación proporcional, ya que a mayor contenido de arcilla en el suelo, la movilidad será menor, lo cual explica que gran parte del Carbofuran es retenido, retardando su movilidad. Los resultados de la caracterización de las cuatro muestras de suelo determinaron que tres de las muestras pertenecen a la clase textural franco y solo una se clasifica como un suelo franco arcilloso.

El potencial de hidrógeno (pH) del suelo también juega un rol importante en la toxicidad de los insecticidas, sobre las bacterias *Azotobacter spp* presentes en el suelo. Si el valor del pH del suelo está por debajo de los 5,5, estas presentan cantidades elevadas y tóxicas de aluminio y magnesio; por lo tanto, existirá poca actividad de organismos y por lo tanto la biodisponibilidad será mayor (Delgado y Fajardo, 2015). En las muestras de suelo tomadas, los análisis determinaron que las cuatro muestras están por encima de los 7 (M01= 7,42; M02= 8,27; M03= 7,40 y M04= 8,66). Asimismo, otro de los factores que interviene en la adsorción del Carbofuran, movilidad y toxicidad para diversos organismos vivos del suelo (*Azotobacter spp*), fue la materia orgánica, ya que, a mayor porcentaje de este componente del suelo, la adsorción del insecticida será mayor; en tal sentido, queda establecido que la cantidad de materia orgánica presente en el suelo determina la toxicidad a la que están expuestos las bacterias (Angelini *et al.*, 2013). Las muestras de suelo presentaron porcentajes

de materia orgánica por debajo del 3 % (M01= 2,68; M02= 2,59; M03= 2,84 y M04= 2,48), clasificándose en un nivel bajo; por lo tanto, la adsorción del Carbofuran fue bajo para las pruebas en campo.

#### **4.2. Evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. en condiciones de laboratorio**

Los resultados de la evaluación del comportamiento poblacional *Azotobacter* spp. en condiciones de laboratorio, determinaron que a medida que pasaban los días y se incrementaba las dosis según el tratamiento, el efecto era mayor, donde en el tratamiento T3-2 se observó un total de 76 colonias muertas a 1 día de aplicado el Carbofuran; mientras que, en el tratamiento T2-3 se observó 517 colonias muertas a los 15 días después de haber aplicado el insecticida, siendo estos los dos mayores números de mortalidad bacteriana alcanzados en los bioensayos, con un total de 40 y 34 %. Similar resultado encontraron Rivera *et al.* (2010), quienes obtuvieron un 50 % de bacterias *Azotobacter chroococcum* que fueron susceptibles frente a la Cipermetrina; donde además sostuvieron que la bacteria *Azotobacter chroococcum* no tiene condiciones de tolerancia al pasar el tiempo a estos activos químicos, teniendo como resultados que las bacterias son susceptibles a los plaguicidas; por lo tanto, concluyó que el uso de plaguicidas podría afectar en un 60 % en la fijación biológica de nitrógeno. Asimismo, Izquierdo (2017) menciona que los compuestos organoclorados como el Carbofuran ocasionan grandes daños al suelo y al ambiente debido a la aplicación indiscriminada en los cultivos, llegando a ocasionar desertificación y compactación de suelos, alterando sus propiedades químicas como el pH, fertilidad y materia orgánica.

Según Díaz (2007) la materia orgánica, porosidad y pH son los principales determinantes de la retención y adsorción de los plaguicidas en el suelo, por otro lado; Delgado y Fajardo (2015) sostienen que la movilidad de Carbofuran depende de la materia orgánica presente en el suelo y que, además, tiene que pasar 120 días para que este activo vaya desapareciendo. En las muestras de suelo utilizado en la investigación presentó un porcentaje promedio de materia orgánica de 2,6 % (nivel bajo), razón por la cual, se presentó una baja absorción del contaminante y un número alto de colonias de *Azotobacter chroococcum* muertas.

El impacto de los agroquímicos es variable y es difícil medir su impacto real, porque su efecto está relacionado con el tiempo de exposición, dosis y vulnerabilidad específica de cada especie e individuo, especialmente cuando se trata de uno de los objetivos de acción afectando el proceso de reproducción y que pone en peligro la sostenibilidad de la microfauna, especialmente la bacteria *Azotobacter* (Chaves *et al.*, 2013). Asimismo, Villacrés (2014) en su investigación menciona que debido a la resistencia de las plagas los agricultores se han visto en la necesidad de mezclar los insecticidas siendo estos más letales y en mayores concentraciones, teniendo como consecuencia graves daños ambientales y al mismo hombre.

#### **4.3. Evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. en condiciones de campo**

Los resultados obtenidos de la evaluación del comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran aplicado al suelo en condiciones de campo, determinaron que a medida que aumentaba la dosis del Carbofuran, los efectos sobre las bacterias *Azotobacter* era mayor en las evaluaciones realizadas en día 1 y 15. En el tratamiento T2-2 hubo mayor incremento de muertes, teniendo un total de 105 colonias muertas a 1 día de aplicado el Carbofuran; mientras que la repetición T3-1 mostró un mayor efecto con 190 colonias muertas a 15 días de aplicado el insecticida, siendo el mayor número de muertes en comparación con los demás tratamientos; estos resultados se relaciona con Rivera *et al.* (2010) y Udochukwu *et al.* (2018) quienes obtuvieron un efecto negativo del fungicida Mankogal y Cipermetrina, sobre el crecimiento de las cepas de *A. chroococcum*, respectivamente. Asimismo, manifiestan que las bacterias son susceptibles a los plaguicidas, es decir, con el transcurso del tiempo estos microorganismos no son capaces de tolerar a estos activos químicos. Similar resultado manifiesta Avellaneda (2022), quien en su investigación determinó que las cepas de *Azotobacter* spp. disminuyeron su población en las diferentes concentraciones de glifosato. Por lo contrario, Kareem y Hasan (2018) determinaron que después de la cuarta semana de supervivencia la bacteria *Bacillus subtilis* con doble dosis de Jantastar en el suelo (264.66 x 107 UFC) fue la más afectada, sin embargo, a partir de la cuarta semana apareció una resistencia debido al cambio de secuencia en las bases del ADN de las bacterias.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Las muestras de suelo utilizadas en la investigación pertenecen a una clase textural de franco a franco arcilloso, con un pH base - alcalino (7,4 – 8,6), con un nivel de materia orgánica de 2 – 3 %, nivel de nitrógeno medio de 0,15 – 0,25 ug/m<sup>3</sup>, nivel de fósforo entre bajo y medio (>12,12 – 24 mg/kg), nivel de potasio bajo (>125 meq/100 g) y una capacidad de intercambio catiónico de (15 a 30 meq/100g). El Carbofuran influyó en los siguientes parámetros físico-químicos del suelo: materia orgánica, textura y pH; estos factores determinan la retención y adsorción de la molécula en la primera capa del suelo; es decir, a mayor porcentaje de materia orgánica y contenido de arcilla, mayor adsorción de Carbofuran.
2. El Carbofuran presentó un efecto significativo tanto en el ambiente de aplicación (bloques) y las diferentes dosis (Tratamientos) sobre pH; concluyendo que existe un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) entre el pH promedio según campo y laboratorio (bloques), teniendo un promedio de 6,8 pH en la fase de campo y 7,3 en la fase de laboratorio, donde se concluye que a medida que pasa el tiempo por la presencia de factores como la temperatura, materia orgánica y escorrentía genera que la alteración del pH por la presencia Carbofuran en el suelo, este vuelva a su estado inicial.
3. Según el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres tratamientos de Carbofuran aplicado al suelo en tres periodos en condiciones de invernadero, se concluye que en el día 1 en el Tratamiento testigo (sin Carbofuran) el número promedio de colonias muertas es cero, en el Tratamiento 1 se reporta 51 colonias, en el Tratamiento 2, 45 colonias y en el Tratamiento 3, se reportaron 62 muertes promedio de colonias; en relación al día 15, el Tratamiento testigo mantiene cero colonias muertas, existiendo un incremento de colonias muertas en relación al día 1, el Tratamiento 1 con 288 colonias, el Tratamiento 2 con 275 colonias y el Tratamiento 3 con 271 muertes promedio de colonias. En relación con la prueba de intervalos de confianza de las diferencias de tratamientos (dosis), existe efecto

significativo ( $p < 0,05$ ) entre las muertes promedio, según los Tratamientos: T1, T2 y T3 con T0 (Tratamiento control).

4. Según el comportamiento poblacional de *Azotobacter* spp. bajo tres concentraciones de Carbofuran aplicado al suelo en tres periodos en condiciones de campo, se concluye que en el día 1 en el tratamiento testigo (sin Carbofuran) el número promedio de colonias muertas es cero, se observó que en el día 15, conforme la dosis de Carbofuran se incrementa, el número promedio de colonias muertas aumenta, sin embargo, se observó una disminución en el tratamiento 2. Se aprecia la dispersión de las muertes de colonias por campo de aplicación, respecto al tratamiento 3 en el día 15 las muertes son superiores a los tratamientos del día 1 y del día 15. Esto debido a que el transcurso de los días, las bacterias se tornan susceptibles al contacto con Carbofuran en las diferentes dosis aplicadas en campo, observándose mayor efecto a través del tiempo en el transcurso de los días.



## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- Difundir los resultados de la investigación para que las entidades competentes encaminen acciones de fortalecimiento y sensibilización a la población, sobre las consecuencias del uso de plaguicidas en la agricultura y su impacto en el ambiente.
- Realizar investigaciones similares en diferentes sembríos y tipos de suelo e incluir la evaluación de otras variables (Pendiente del terreno, precipitaciones pluviales, humedad relativa, etc.) para tener mayor conocimiento sobre los efectos que produce el Carbofuran sobre el comportamiento poblacional de *Azotobacter* y aquellas especies de microorganismos que fijan nitrógeno y contribuyen con la fertilidad de los suelos.
- Dar cumplimiento al marco legal nacional e internacional que regula el uso de agroquímicos en la agricultura e incentivar el desarrollo de nuevas alternativas en el manejo de los campos de cultivo: como el uso de microorganismos eficientes, bacterias benéficas, entre otros; y de esta manera, promover una agricultura sostenible, con el objetivo de minimizar el uso de venenos en la producción agrícola.
- Realizar un manejo integrado de plagas y enfermedades por parte de los extensionistas, técnicos o agricultores; identificando a detalle el causal de las plagas o enfermedades que está afectando a un cultivo para determinar las estrategias de control a implementar. Asimismo, realizar un plan de monitoreo que permita conocer los niveles de presencia para la toma de decisiones para el control de dichas plagas o enfermedades donde el uso de insecticidas sea la última opción.

## REFERENCIAS

- Acosta, S. L. y Gil, R. J. (2015). *Diagnostico Hídrico Base Cuencas que Abastecen de agua para el servicio de Saneamiento de Rioja*. [https://www.sunass.gob.pe/MRSE/1dhr\\_rioja\\_vfinal\\_21\\_12\\_15.pdf](https://www.sunass.gob.pe/MRSE/1dhr_rioja_vfinal_21_12_15.pdf)
- Alza, C. W. R., García, C. J. M. y Chaparro, A. S. P. (2016). Estimación del riesgo de contaminación de fuentes hídricas de pesticidas (Mancozeb Carbofuran) en Ventaquemada, Boyacá – Colombia. *Acta Agronómica*. 65(4), 368-374. <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v65n4/v65n4a07.pdf>
- AL-Ani, M, A., Hmoshi, R, M., Kanaan, I, A. y Thanoonl, A, A. (2019). Effect of pesticides on soil microorganisms. *In Journal of Physics: Conference Series*. (vol. 1294, N°. 7, p. 072007. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1294/7/072007/pdf>
- Avellaneda, V, M, E. (2022). Efecto del glifosato sobre la población de *Azotobacter* spp. presente en el suelo cafetalero de El Dorado, Moyobamba – San Martín. (Tesis de grado). Universidad Católica Sedes Sapientiae, Perú. [https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/1568/Avellaneda\\_Marco\\_tesis\\_2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/1568/Avellaneda_Marco_tesis_2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Barrero, C. L. (2016). Microbiología Clínica. *Editorial Síntesis*. ISBN: 978-84-9077-318-5 <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- Bravo, D. V., De la Cruz, M. E., Herrera, L. G., y Ramírez, M. F. (2013). Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud. *Uniciencia*, 27(1), 351-376. <https://www.redalyc.org/pdf/4759/475947762021.pdf>
- Beltrán, P. M. E. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15(1), 101-113. <http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/401>
- Bernal, G. G. (2015). La Microbiología de Suelos en el Ecuador: *Situación actual de la investigación*. Edición: MassGráficos-Quito. <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/1.-La-Microbiologia-de-Suelos.pdf>
- Calvo, G. S. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Cuadernos del Tomás*. (3), 173-186. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3761553>

- Castellanos, R. J. (2008). *Aislamiento y caracterización de bacterias degradadoras de carbofuran presentes en suelos cultivados con papa (Solanum tuberosum) del municipio de Silos Norte de Santander*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1864/1/T-UCE-0008-08.pdf>
- Chaves, B. G., Ortiz, M. M. L. y Ortiz, R. L. Y. (2013). Efecto de la aplicación de agroquímicos en un cultivo de arroz sobre los microorganismos del suelo. *Acta Agronómica*. 62(1), 66-72. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/40864/30023-187512-2-PB.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Constanza, C. L., Antolínez, R. D. M., Bohórquez, M. J. A., y Corrales, V. A. M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*. 13(24), 55-81. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v13n24/v13n24a06.pdf>
- Del Puerto, R. A. M., Suárez, T. S. y Palacio, E. D. E. (2014). Efecto de los plaguicidas en el ambiente y la salud. *Revista Cubana de higiene y epidemiología*. 52(3), 372-387. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v52n3/hig10314.pdf>
- Delgado, Z. J., Álvarez, A. R., y Yáñez, J. A. (2018). Uso indiscriminado de pesticidas y ausencia de control sanitario para en mercado interno en el Perú. *Revista Panamericana de salud pública*. 42, e3. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.3>
- Delgado, S. M. A. y Fajardo, G. P. (2015). *Determinación de la movilidad del carbofuran en suelos de un cultivo de papa ubicado en el municipio de Villapinzón-Cundinamarca*. (Tesis de grado). Universidad de Santo Tomás. Bogotá, Colombia. <https://repositorio.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2872/2015mariadelgado.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Díaz, T. M. V. (2007). *Estudios del sistema suelo-surfactante-plaguicida en los procesos de adsorción y desorción de atrazina, mbt y clorpirifos*. (Tesis de grado). Universidad de Chile, Chile. [http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2007/diaz\\_m/sources/diaz\\_m.pdf](http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2007/diaz_m/sources/diaz_m.pdf)
- Domínguez, J. (2015). Manual de metodología de la investigación científica (MIMI). [https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2018/manual\\_de\\_metodologia\\_de\\_investigaci%C3%B3n\\_cient%C3%ADfica\\_MIMI.pdf](https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2018/manual_de_metodologia_de_investigaci%C3%B3n_cient%C3%ADfica_MIMI.pdf)
- Escobar, C., Horna, Carreño, C. y Mendoza, G. (2011) Caracterización de cepas nativas de *Azotobacter* spp. y su efecto en el desarrollo de *Lycopersion esculentum* Mill. “tomate”

en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. 2(1), 39-49.  
<https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633697005.pdf>

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 crecimiento en plantas*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.  
<https://repositorio.unprg.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12893/1123/BC-TES-5903.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Farmagro (s.f.). Farmadan. *Ficha técnica Farmagro S.A.*  
[http://www.farmagro.com.pe/media\\_farmagro/uploads/ficha\\_tecnica/farmadan\\_-ficha\\_tecnica\\_jbPsIkP.pdf](http://www.farmagro.com.pe/media_farmagro/uploads/ficha_tecnica/farmadan_-ficha_tecnica_jbPsIkP.pdf)

Flores, M. J. D., Leal, M. G. I., Ardila, L. L. D., Cárdenas, C. D. M. (2017). Aislamiento y caracterización de Rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (Orza sativa L.) del norte de Santander (Colombia). *Agrociencia*. 51(4), 373-391  
<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n4/1405-3195-agro-51-04-00373.pdf>

Garmashov, V.M., Nuzhnaya, N.A. y Garmashova, L.V. (2021). Desarrollo de *azotobacter* en agroceosis saturada con herbicidas que contienen glifosato. *Revista internacional de investigación*, (9-1(111)), 89-93. <https://research-journal.org/agriculture/razvitie-azotobaktera-v-agrocenoza-nasysshennyx-glifosatsoderzhashhimi-gerbicidami/>

Germida, J. J. (1993). Cultural methods for soil microorganisms. Soil sampling and methods of analysis. MR Carter editor. *Canadian Society of Soil Science*. 263-275.  
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c37>

Gulhane, P. A. Gomashe, A. V. y Sundarkar, K. M. (2015). Influence of pesticides on nitrogen fixing bacteria. *International Journal of Technical Research and Applications*. 3(4), 57-160. <https://www.ijtra.com/view/influence-of-pesticides-on-nitrogen-fixing-bacteria.pdf>

Huayhua, C. L. T. (2016). *Efecto de la administración crónica de Carbofurano en la histología testicular de Rattus norvegicus variedad Sprague Dawley*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú.  
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2378/BIhuchlt.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Izquierdo, R. J. J. (2017). *Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia San Joaquín*. (Tesis de grado). Universidad Politécnica

- Jiménez, A. D. J. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción de la DNA ribosomal 16S*. (Tesis de grado). Pontificia universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8544/tesis14.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Kareem, M. F. A. y Hasan, A. E. (2018). Effect of pesticide residues concentrations in the growth of some soil bacteria. *Plant Archives*. 18(2), 1679-1683. [http://plantarchives.org/18-02/1679-1683%20\(4259\).pdf](http://plantarchives.org/18-02/1679-1683%20(4259).pdf)
- Lara, M. C., Villalba, A. N. y Oviedo, Z. L. E. (2007). Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola se San Carlos. Córdoba, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2), 6-14. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/711/1182>
- López, J. L.E., Hernández, D. M., Colín, C. C.A., Ortega, P. S., Cerón G. G., y Franco, C. R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdisc/ir-2014/ir141b.pdf>
- Ministerio del Ambiente (2014). Guía para el muestreo de suelos. [http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO\\_MINAM1.pdf](http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf)
- Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 14(2), 1-10. <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/153>
- Qardash, A. A. F., Al-Helali, M. F., Thabet, A. A. M. y Ba'abad, M. A. (2019). Study on the effects of six pesticides on soil bacteria in laboratory. *Asian Journal of Crop, Soil Science and Plant Nutrition*. 1(01), 17-22. [https://www.journalbinet.com/uploads/2/1/0/0/21005390/03.01.2019\\_study\\_on\\_the\\_effects\\_of\\_six\\_pesticides\\_on\\_soil\\_bacteria\\_in\\_laboratory\\_3.pdf](https://www.journalbinet.com/uploads/2/1/0/0/21005390/03.01.2019_study_on_the_effects_of_six_pesticides_on_soil_bacteria_in_laboratory_3.pdf)
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2014). Código internacional de conducta para la gestión de plaguicidas. ISBN: 978-92-5-308549-0 <http://www.fao.org/3/a-i3604s.pdf>

- Pozo, L. A. P. (2013) *Estudio de residuos de carboburán y metamidofos en papa (Solanum tuberosum) consumida en la sierra ecuatoriana.* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1864/1/T-UCE-0008-08.pdf>
- Rivera, D., Camelo, M., Estrada, G., Obando, M. y Bonilla, R. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(1), 94-102. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77617786010.pdf>
- Rivera, D., Obando, M., Garrido, M. F., y Bonilla, R. (2011). Effect of agrochemicals in cotton seed pellets on Monibac® biofertiliser based on *Azotobacter chroococcum*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(2), 130-138. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612011000200015](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612011000200015)
- Rodríguez, S. J., Ríos, R. Y. y Baró, R. Y. (2016). Efectividad de cepas de *Azotobacter sp.* y *Bacillus sp.* para el control de especies fúngicas asociadas a hortalizas. *Cultivos tropicales*. INCA. 37, 13-19. ISSN: 1819-4087. DOI: 10.13140/RG.2.1.1385.9443. <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193246189002.pdf>
- Ruiz, G. A. (2015). *Situación del uso de pesticidas en la producción agrícola en el distrito de Fernando lores: centro poblado de Panguana primera zona, Tamshiyacu y Santa Ana primera zona-loreto 2015.* (Tesis de grado). Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos, Perú. <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/3266/TESIS%20PARA%20LIBRO%20ANA%20RUIZ%20GARCIA-modificado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Santana, A. D., Colina, N. E., Castro, A. C., Cadena, P. D., Sotomayor, M. A., Galarza, C. E., y López, V. M. (2017). Microorganismos Fijadores De Nitrógeno y Su Acción Complementaria A La Fertilización Química En El Cultivos De *Coffea arabica* L. *European Scientific Journal* [en línea], 13(3). <http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v13n3p211>
- Salazar, A. M. y Ordoñez, C. A. (2013). *Aislamiento de identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en el suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira.* (Tesis de Grado). Universidad tecnológica de Pereira, Colombia. <https://core.ac.uk/download/pdf/71397057.pdf>
- Sánchez, L. D. B., Pérez, P. J. V., Luna, C. L. L., García, P. J. A. y Espitia, M. A. A. (2019). *Azotobacter choococcum* y *Azopirillum lipoferum* como bioestimulantes en cultivo de

*Ipomea batatas* Lam. *Agronomía Mesoamericana*. 30(2), 563-576.  
[http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v30n02\\_563.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v30n02_563.pdf)

Suquilanda, V. y Manuel, B. (1995). “Agricultura Orgánica; alternativa ecológica del futuro”. Ediciones UPS. *Fundación para el desarrollo agropecuario FUNDAGRO*.  
<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=FDTAVP.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000187>

Udochukwu, U., Dave-Omoregie, A. O., y Akaluzia, H. C. (2018). Effects of Pesticide Application on the Growth of Soil Nitrifying Bacteria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 22(3), 304-307. DOI:  
<https://dx.doi.org/10.4314/jasem.v22i3.2>

Villacrés, E. N F. (2014). “*El uso de plaguicidas químicos en el cultivo de papa (solanum tuberosum), su relación con el medio ambiente y la salud*”. (Tesis de maestría). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/7003/1/tesis-011%20Maestr%C3%ADa%20en%20Agroecolog%C3%ADa%20y%20Ambiente%20-%20CD%20227.pdf>

Villaseñor, O. D. (2016). Fundamentos y procedimientos para análisis físicos y morfológicos del suelo. *Primera edición 2015*. ISBN: 978-9942-24-082-8  
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10690/1/FUNDAMENTOS%20Y%20PROCEDIMIENTOS.pdf>

## TERMINOLOGÍA

**Agricultura.** Dinámica entre factores bióticos y abióticos, mediante una interrelación establecida y compleja ente el suelo, plantas y microorganismos (Beltrán, 2008).

**Adsorción de plaguicida.** El fenómeno de atracción entre una superficie sólida y un líquido o vapor. A través de este mecanismo, las moléculas de pesticidas pueden ser adsorbidas o retenidas por coloides existentes en el suelo, la arcilla y la materia orgánica durante el proceso de lixiviación (Huayhua, 2016).

**Colonia.** Una colonia es una masa de células la cual se puede visualizar sin necesidad de un microscopio sobre el medio de cultivo que se ha preparado, estas bacterias que forman la colonia pertenecen a la misma especie bacteriana (Barrero, 2016).

**Dosis.** Proporción de un medicamento, o una droga para prevenir o curar una plaga o enfermedad (Bernal, 2015).

**Esterilización.** Es un proceso mediante el cual se eliminan todas las formas de vida existentes en un medio, incluyendo esporas (Barrero, 2016).

**Insecticida.** Son compuestos químicos y un tipo de plaguicida, el cual es usado para matar y controlar insectos; se clasifican según su estructura y modo de acción (Delgado y Fajardo, 2015).

**Movilidad del plaguicida.** Es la facilidad con la que el plaguicida se lixivia, es decir la facilidad con la que es arrastrado junto con el agua de riego o de la lluvia a través de la profundidad del suelo, incluso hasta las aguas subterráneas, la movilidad depende de la solubilidad del plaguicida en el agua y de su afinidad con el suelo, además de las propiedades físicas y químicas del suelo acción (Delgado y Fajardo, 20 15).

**Pesticida.** Producto sintético y orgánicos fitosanitarios, cuya función principal es controlar plagas que obstaculizan el buen desarrollo de los productos agrícolas (Bravo *et al.*, 2013).



**Proceso microbiológico.** son esos estudios que se conducen a cabo en el laboratorio, usando bacterias, seleccionando esas que tienen la posibilidad de ser útiles, o en otro caso es la obtención de cepas mejoradas (Escobar *et al.*, 2011).

**Siembra de bacterias.** inocular es meter artificialmente una cantidad de muestra (inóculo) en un medio conveniente, con la intención de empezar un cultivo microbiano. Después de plantado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura idónea para el aumento del o los microorganismos de interés (Escobar *et al.*, 2011).

**Tóxico.** Es cualquier elemento que, siendo ingerido, inhalado, aplicado, inyectado, absorbido o suministrado de cualquier manera, puede ser nocivo para la salud y el ambiente. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos, su acción depende de la dosis, circunstancias individuales y condiciones ambientales (Pozo, 2013).

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Autorización del uso del terreno para la ejecución del proyecto

#### **“Año de la universalización de la salud”**

Nueva Cajamarca, 18 de enero del 2020.

Estimados

**ALEX JORDANY DÍAZ FONSECA**

**MARÍA ANAÍ GARCÍA HERRERA**

Bach. En Ciencias Ambientales

**Asunto: AUTORIZACIÓN DE USO TEMPORAL DE TERRENO**

De mi especial consideración.

Estimados alumnos, mediante el presente el Sr. Alejandro Díaz Alejandría, identificado con DNI 80195455, con domicilio en el caserío la Primavera del Alto Mayo, Provincia y Distrito de Moyobamba, en calidad de propietario de la finca el Laurel autoriza a los tesisistas Alex Jordany Díaz Fonseca y María Anaí García Herrera, para los fines que ustedes expresan: obtención de muestras para la ejecutar su investigación para la obtención de su título profesional.

El uso de la finca en mención deberá hacerse de acuerdo al perfil del proyecto, y al finalizar el proyecto se deberá ser adecuadamente restaurado y nivelado los puntos de muestreo.

Sin otro particular, quedo agradecido por su atención.

Atentamente



Alejandro Díaz Alejandría

Propietario del terreno

DNI: 80195455

## Apéndice 2. Ficha técnica del insecticida Farmadan 480 g/L

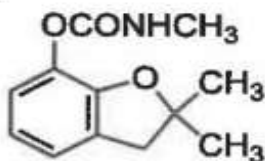
### FICHA TECNICA FARMADAN

#### DATOS DE LA EMPRESA

Empresa Comercializadora	: FARMAGRO S.A.
Titular de Registro	: SHARDA PERU S.A.C.
Número de Registro	: PQUA N° 475-SENASA

#### IDENTIDAD

Composición	: Carbofuran
Concentración	: 480 g/L
Formulación	: Suspensión concentrada
Grupo Químico	: Carbamato
Clase de Uso	: Insecticida - Nematicida.
Fórmula Empírica	: $C_{12}H_{15}NO_3$
Fórmula Estructural	:



Peso Molecular	: 221.3 g/mol
----------------	---------------

#### CARACTERISTICAS

**FARMADAN** es un insecticida-nematicida a base de carbofuran que aplicado al follaje actúa por contacto e ingestión y con gran efecto residual. Cuando es aplicado al suelo actúa como insecticida y nematicida sistémico al ser absorbido por la raíces. No usar el producto en suelos arenosos ni en zonas con napa freática superficial.

#### PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Densidad Relativa	: 1.13 (20° C)
pH	: 6.5-7.5
Estado Físico	: Líquido
Color	: Blanco
Olor	: Olor fenólico
Estabilidad en Almacenamiento	: Es estable bajo condiciones normales de manipulación y almacenamiento por 2 años.
Explosividad	: No explosivo
Corrosividad	: No corrosivo

#### MODO DE ACCION

**FARMADAN** por contacto e ingestión.

#### MECANISMO DE ACCION

**FARMADAN** inhibe la acción de la Acetil Colinesterasa, ocurriendo un aumento de LA enzima acetilcolina, produciendo síntomas en el insecto de hiper excitación, parálisis; provocándole la muerte.

#### RECOMENDACIONES DE USO

CULTIVO	PLAGA		DOSIS		PC (días)	LMR (ppm)
	Nombre común	Nombre científico	L/200L	L/ha		
Algodón	Pulgón de la maleza	<i>Aphis gossypii</i>	0.075 – 0.1	0.3 – 0.4	-	-
Marigold	Mosquita de los brotes	<i>Prodidiplosis longifila</i>	0.4 – 0.6	0.8 – 1.5	50	1
Papa	Gorgojo de los andes Pulga saltona	<i>Premnotrypes latithorax</i> <i>Epirrix sp.</i>	0.4 – 0.6	0.8 – 1.5	30	1
Vid	Filoxera Nemátodo del nudo	<i>Viteus vitifoliae</i> <i>Meloidogyne incognita</i>	2.6 – 3.0 2.3 – 2.6	7.8 – 9.0 6.9 – 7.8	14	0.3

P.C.: Período de Carencia

LM.R.: Límite máximo de residuos

#### CONDICIONES DE APLICACIÓN

**FARMADAN** se recomienda cuando la infestación se encuentra dentro del nivel del umbral de daño económico. Como máximo dos aplicaciones al año.

#### COMPATIBILIDAD

**FARMADAN** es compatible con plaguicidas de uso común, excepto con los de reacción alcalina.

#### REINGRESO A UN ÁREA TRATADA

No ingresar a las áreas tratadas hasta 48 horas después de la aplicación.

#### FITOTOXICIDAD

**FARMADAN** no presenta riesgo de fitotoxicidad si se aplica en el momento y dosis recomendada.

#### CATEGORIA TOXICOLÓGICA

Altamente peligroso

Apéndice 3. Reporte del análisis físico-químico del suelo



**LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA**  
**San Martín**  
 GOBIERNO REGIONAL  
 El trabajo está primario

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca  
 Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 550443

RESULTADO DE ANALISIS DE SUELO - CARACTERIZACION



NOMBRE : ALEX JORDANY DÍAZ FONSECA  
 PROCEDENCIA : Parcela Huascarán - Primavera del Alto Mayo, Moyobamba  
 FECHA DE INGRESO : 21-Set-20  
 Efecto del Carbofuran sobre la población de Azotobacter spp. en suelos cafetaleros del caserío La Primavera, Moyobamba - 2020

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm  
 FECHA DE REPORTE : 1-Oct-20  
 CULTIVO : Café  
 ATENCION : B. de V. N° 0001-004432 del 23 de setiembre

Nro	CLAVE LABORATORIO	DETERMINACION	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico						Análisis Químico												
				Textura			Clase Textural	Densidad aparente	pH	Conductividad Eléctrica	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capac. de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					
				Arena	Arilla	Limo							N	P	K		Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>+++</sup>	Saturación de Al
%	%	%	%	%	1:1	µS / cm	%	%	%	ppm	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo	meq / 100 gr de suelo	meq / 100 gr de suelo	meq / 100 gr de suelo	meq / 100 gr de suelo	%				
1	ASC20 - 0193	M - 01	Alex Jordany Diaz Fonseca	38.36	22.12	39.52	Franco	1.39	7.42	0.00158		2.682	0.121	9.66	80.70	12.66	10.60	1.59	0.26	0.21	Trazas	0%
2	ASC20 - 0194	M - 02	Alex Jordany Diaz Fonseca	38.44	26.04	35.52	Franco	1.37	6.27	0.00164		2.590	0.116	10.70	86.40	11.66	9.88	1.48	0.26	0.22	Trazas	6.8%
3	ASC20 - 0195	M - 03	Alex Jordany Diaz Fonseca	36.40	24.00	39.60	Franco	1.37	7.40	0.00062		2.840	0.128	18.20	106.10	13.28	11.12	1.67	0.22	0.27	Trazas	0%
4	ASC20 - 0196	M - 04	Alex Jordany Diaz Fonseca	32.32	34.04	33.64	Franco Arcilloso	1.31	8.66	0.00119		2.480	0.112	7.60	89.40	14.61	12.40	1.74	0.24	0.23	Trazas	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 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

Vº Bº Ing. Carlos Egoavil De la Cruz  
 C.I.P. N° 52743



B. de V. N° 0001-004432  
 Laboratorio de Suelos



Apéndice 4. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-01



**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 - CARACTERIZACIÓN

**NOMBRE** : ALEX JORDANY DÍAZ FONSECA  
**PROCEDENCIA** : Parcela Huascarán - Primavera del Alto Mayo, Moyobamba  
**FECHA DE INGRESO** : 21-Set-20  
Efecto del Carbofuran sobre la población de Azotobacter spp. en suelos cafetaleros del caserío La Primavera, Moyobamba - 2020

**PROFUNDIDAD** : 0 - 30 cm  
**FECHA DE REPORTE** : 1-Oct-20  
**CULTIVO** : Café  
**ATENCIÓN** : B. de V. N° 0001-004432 del 23 de setiembre

Nro	CLAVE LABORATORIO	EDAD DEL CULTIVO	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 <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>+++</sup>	
1	ASC20 - 0193	M - 01	Alex Jordany Díaz Fonseca	38.38	22.12	39.52	Franco	1.39	7.42	0.00158	2.682	0.121	9.66	80.70	12.68	10.80	1.59	0.26	0.21	Trazas	0%	

**METODOLOGÍA EMPLEADA EN LOS ANÁLISIS:**

Textura	: Hidrómetro de Bouyoucos	Materia Orgánica	: Walkley y Black	Sodio y Potasio	: Fotometría de Llama
pH	: Potenciometro 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 cambiante	Acidez Activa	: Yuan, extracción con KCl 1N

NºB/ Ing. Carlos Escóvil De la Cruz  
C.I.P. N° 32743



Renán Ruiz Flores  
Laboralista de Suelos

Apéndice 5. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-02



**LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA**  
**San Martín**  
 GOBIERNO REGIONAL  
*¿el cambio está primando?*

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 : ALEX JORDANY DÍAZ FONSECA  
 PROCEDENCIA : Parcela Huascarán - Primavera del Alto Mayo, Moyobamba  
 FECHA DE INGRESO : 21-Set-20  
 Efecto del Carbofuran sobre la población de Azotobacter spp. en suelos cafetaleros del caserío La Primavera, Moyobamba - 2020

PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm  
 FECHA DE REPORTE : 1-Oct-20  
 CULTIVO : Café  
 ATENCION : B. de V. N° 0001-004432 del 23 de setiembre

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			Capacidad de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					
				Arena %	Arilla %	Limo %							N %	P ppm	K ppm		Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>+++</sup>	Saturación de Al %
1	ASC20 - D194	M - 02	Alex Jordany Díaz Fonseca	38.44	26.04	35.52	Franco	1.37	8.27	0.00164		2.590	0.116	10.70	86.40	11.86	9.88	1.48	0.28	0.22	Trazas	6.8%

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 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       |

YB/ Ing. Carlos Espinosa de la Cruz  
 C.I.P. N° 32743



Laboratorio de Suelos

Apéndice 6. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-03



**LABORATORIO DE ANÁLISIS AGRÍCOLAS DE SUELOS - ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE NUEVA CAJAMARCA**  
**San Martín**

GOBIERNO REGIONAL  
 #Desarrollo con orgullo!

Av. Cajamarca Norte N° 1151, Los Olivos IV Etapa - Distrito de Nueva Cajamarca  
 Provincia de Rioja, San Martín. Teléfono 550443



RESULTADO DE ANÁLISIS DE SUELO - CARACTERIZACIÓN  
 PROMEDIO DE REPETICIONES POR TRATAMIENTO

NOMBRE : ALEX JORDANY DÍAZ FONSECA PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm  
 PROCEDENCIA : Parcela Huascarán - Primavera del Alto Mayo, Moyobamba FECHA DE REPORTE : 1-Oct-20  
 FECHA DE INGRESO : 21-Sep-20 CULTIVO : Café  
 Efecto del Carbofuran sobre la población de Azotobacter spp. en suelos cafetaleros del caserío La Primavera, Moyobamba - 2020 ATENCIÓN : B. de V. N° 0001-004432 del 23 de setiembre

Nro	CLAVE LABORATORIO	CLAVE CAMPO	PROCEDENCIA y/o AGRICULTOR	Análisis Físico						Análisis Químico												
				Textura			Clase Textural	Densidad Aparente	pH	Conductividad Eléctrica	Carbonatos	Materia Orgánica	Elementos Disponibles			Capacidad de Intercambio Catiónico	Elementos Cambiables					
				Arena	Arrolla	Limo							N	P	K		Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>+++</sup>	Saturación de Al
				%	%	%	%	ppm	ppm	meq / 100 gr de suelo	%	%	%	%	%	%						
1	ASC20 - 0195	M - 03	Alex Jordany Diaz Fonseca	36.40	24.00	39.60	Franco	1.37	7.40	0.00062	2.840	0.128	18.20	106.10	13.28	11.12	1.67	0.22	0.27	Trazas	0%	

METODOLOGIA EMPLEADA EN LOS ANALISIS:

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

Vº Ing. Carlos Egóvil De la Cruz  
 C.I.D. Nº 32743



Geoder Ruiz Flores  
 Laboratorista de Suelos



Apéndice 7. Reporte del análisis físico-químico del suelo del punto M-04



**San Martín**  
GOBIERNO REGIONAL  
*El espíritu es el camino*

**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 - CARACTERIZACIÓN

NOMBRE : ALEX JORDANY DIAZ FONSECA PROFUNDIDAD : 0 - 30 cm  
 PROCEDENCIA : Parcela Huascarán - Primavera del Alto Mayo, Moyobamba FECHA DE REPORTE : 1-Oct-20  
 FECHA DE INGRESO : 21-Sep-20 CULTIVO : Café  
 Efecto del Carbofuran sobre la población de Azotobacter spp. en suelos cafetaleros del caserío La Primavera, Moyobamba - 2020 ATENCIÓN : B. de V. N° 0001-004432 del 23 de setiembre

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					
				Arena %	Arcilla %	Limo %							N %	P ppm	K ppm		Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Al <sup>+++</sup>	Saturación de Al %
1	ASC20 - 0196	M - 04	Alex Jordany Diaz Fonseca	32.32	34.04	33.64	Franco Arcilloso	1.31	8.66	0.00119	2.480	0.112	7.60	89.40	14.61	12.40	1.74	0.24	0.23	Trazas	0%	

METODOLOGÍA EMPLEADA EN LOS ANÁLISIS:

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 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

Vr: Ing. Carlos Espinosa de la Cruz  
C.U.P. N° 32749



Laboratorista de Suelos

#### Apéndice 8. Protocolo según Villaseñor (2016).

- Homogenizar la muestra que ha ingresado al laboratorio desde el predio o campo, disgregando los terrones manualmente o aplicando presión con un martillo o mazo de madera. Eliminar rocas y residuos vegetales de mayor tamaño como ramas o raíces gruesas, así como también restos de insectos y otros organismos visibles.
- Separar una porción de al menos 500 g de la muestra del terreno (muestra de laboratorio o muestra de suelo) y esparcirla sobre una bandeja cubierta por una lámina de plástico, para evitar algún tipo de contaminación. El espesor de la capa de la muestra de suelo en la bandeja no debe superar los 15 mm.
- Secar la muestra al aire, dejando la bandeja en un ambiente ventilado libre de contaminación (en lo posible habilitar sala de secado), o bien en estufa a una temperatura que no supere los  $40 \pm 2$  °C, hasta que la pérdida de masa no sea mayor del 5 % en 24 horas.
- Tamizar la muestra a través del tamiz de 2mm. Los terrones que no pasan por el tamiz se disgregan (no se muelen) con movimientos circulares del pistilo en el mortero y se vuelven a tamizar.
- La muestra de fracción  $< 2$  mm se homogeniza y se almacena en una bolsa o recipiente plástico y esta constituirá la muestra de suelo seco al aire que se somete a los procedimientos analíticos usuales. El remanente de la muestra de terreno se almacena en una bolsa plástica y permanece como contramuestra.

#### Apéndice 9. Protocolo establecido por Jiménez (2007), para medir el pH.

- Mezclar en un vaso una proporción 1:1 de agua destilada y suelo tamizado.
- Remover bien la mezcla agua y suelo con una cuchara u otro utensilio, remover la mezcla por 30 segundos y dejar reposar por 5 minutos.
- Medir el pH del sobrenadante utilizando un pH-metro o tiras de pH.

Apéndice 10. Cadena de custodia para muestreo de suelos por MINAM (2014).

- El número de la hoja de custodia proporcionada por el laboratorio acreditado.
- El nombre de la empresa y del responsable del muestreo.
- Los datos de identificación del sitio (coordenadas UTM).
- La fecha y hora del muestreo.
- Las claves de las muestras.
- Nombre del laboratorio que recibe las muestras.
- Los análisis o la determinación requerida.
- El número de envases.
- Observaciones.
- Identificación de las personas que entregan y reciben en cada una de las etapas de transporte, incluyendo fecha y hora.