

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Evaluación de la sanidad de suelo después de la aplicación de biocidas y su efecto en la resistencia al patógeno *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*)

Raúl Alejandro León Arregui

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 17 de diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Evaluación de la sanidad de suelo después de la aplicación de biocidas y su efecto en la resistencia al patógeno *Phytophthora infestans* en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*)

Raúl Alejandro León Arregui

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, PhD

Quito, 17 de diciembre de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Raúl Alejandro León Arregui

Código: 00200102

Cédula de identidad: 1724762537

Lugar y fecha: Quito, 17 de diciembre de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Las papas son uno de los cultivos de importancia dentro del Ecuador ya que en el mismo se cultivan aproximadamente 300000 toneladas para su consumo anual. Lamentablemente existen enfermedades como *Phytophthora infestans* las cuales afectan directamente a estos cultivos provocando la pérdida completa. A raíz de esto, los agricultores aplican gran cantidad de biocidas con la finalidad de controlar estas enfermedades. Lo que no conocen es que estos biocidas pueden llegar a tener efectos negativos sobre la sanidad del suelo. Por esta razón, se busca realizar medidas de sanidad de suelo para comprobar los efectos de aplicar biocidas como el Dazomet, Kasugamicina, Pentacloronitrobenzeno, Dicloropropeno + Cloropicrina, Cimoxanilo + oxiclورو de cobre + mancozeb y el Fosetyl + propamocarb. Se comprobó por parámetros biológicos con metodologías como carbón activo y la tasa de respiración basal, que los suelos tienen un aumento del carbón activo de aproximadamente un 55 a 255% en comparación al control, mientras que existe una reducción de la respiración basal de aproximadamente un 3 a 39%. Con respecto al crecimiento existen biocidas como el Dazomet que permiten a las plantas de papa crecer mucho mejor hasta un 54%, debido a que permiten una mejor disponibilidad de nutrientes, pero en otros casos el crecimiento se ve completamente reducido como la Kasugamicina el cual presento una reducción del 24%. A pesar de encontrarse todos estos efectos, se encontró que la aplicación de biocidas realmente no tiene un efecto positivo sobre la resistencia a este patógeno. Encontramos que la mayoría de tratamientos muestran una tendencia a ser más susceptibles a esta enfermedad, en lugar de crear resistencia como normalmente se cree.

Palabras clave: Biocidas, sanidad, papas, *Phytophthora infestans*, resistencia, crecimiento

ABSTRACT

Potatoes are one of the most important crops in Ecuador, approximately 300,000 tons are grown there for annual to feed. Unfortunately there are diseases such as *Phytophthora infestans* which directly affect these crops causing the complete loss of crops. As a result, farmers apply large amounts of biocides in order to control these diseases. What they do not know is that these biocides can have negative effects on the soil health. For this reason, it seeks to carry out soil health measures to verify the effects of applying biocides such as Dazomet, Kasugamycin, Pentachloronitrobenzene, Dichloropropene + Chloropicrin, Cymoxanil + copper oxychloride + mancozeb and Fosetyl + propamocarb. It was verified by biological parameters with methodologies such as activated carbon and basal respiration rate, that soils have an increase in activated carbon of approximately 55 to 255% compared to with control, while there is a reduction in basal respiration of approximately one 3 to 39%. Regarding growth, there are biocides such as Dazomet that allow potato plants to grow much better up to 54%, because they allow a better availability of nutrients, but in other cases the growth is completely reduced such as Kasugamycin which present a reduction of 24%. Despite finding all these effects, it was found that the application of biocides does not really have a positive effect on resistance to this pathogen. We found that most treatments show a tendency to be more susceptible to this disease, rather than creating resistance as is normally believed.

Key words: Biocides, health , potato, *Phytophthora infestans*, resistance, growth

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	11
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
	2.1 Metodología de POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana	14
	2.2 Diseño experimental.....	14
	2.3 Medición de parámetros fisicoquímicos y de sanidad del suelo	14
	2.4 Medición de parámetros de crecimiento.....	15
	2.5 Medición de severidad de la infección.....	15
	2.6 Análisis de datos.....	15
3.	RESULTADOS.....	17
	3.1 Estandarización de la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana	17
	3.2 Medidas de pH y conductividad para suelos tratados con biocidas	17
	3.3 Medidas de sanidad para suelos tratados con biocidas	18
	3.4 Medidas de crecimiento para plantas cultivadas en suelos tratados con biocidas .	19
	3.5 Severidad de infección	19
4.	DISCUSIÓN.....	21
	4.1 Estandarización de la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana	21
	4.2 Efectos de suelos tratados con biocidas en parámetros de sanidad, crecimiento y resistencia a <i>Phytophthora infestans</i>	22
5.	CONCLUSIONES.....	25
6.	TABLAS.....	26
7.	FIGURAS.....	28
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias relativas de uso de biocidas y su efecto en los parámetros medidos.....	26
Tabla 2. Información completa sobre biocidas utilizados	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estandarización de la metodología POX-C con suelos de la sierra ecuatoriana.....	27
Figura 2. Media para pH y conductividad de suelos con tratamientos de biocidas.....	28
Figura 3. Media de parámetros de sanidad de suelo para muestras con tratamientos de biocidas.....	29
Figura 4. Media de crecimiento para plantas de papa cultivadas en suelos tratados con biocidas.....	30
Figura 5. Media de severidad para plantas de papa infectadas con <i>Phytophthora infestans</i>	31

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo detallado estandarización de metodología POX-C
.....36

ANEXO 2: Metodología de respiración basal
.....39

1. INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo, busca comprender cuáles son los efectos sobre la aplicación de biocidas sobre distintos parámetros de sanidad de suelo. Así mismo, ver si estos cambios, tienen efectos positivos o negativos en el crecimiento de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y cómo afectan a la resistencia de patógenos como *Phytophthora infestans*.

La realización de esta investigación está dada ya que la degradación de los suelos es una de las mayores problemáticas que afecta a la agricultura tanto a nivel nacional como internacional. Es provocado por el uso excesivo de biocidas que reducen la sanidad del suelo, generando que los cultivos sean más propensos a crecer menos, que sean susceptibles a diferentes patógenos o que dejen de tener un desarrollo normal (Burbano, 2017).

En consecuencia, conocer detalladamente sobre la sanidad del suelo es un factor importante para comprender los niveles de afectación en los mismos. Debemos entender que la sanidad, hace referencia a la capacidad de un suelo de poder funcionar como un ecosistema vivo, permitiendo que diferentes organismos puedan subsistir óptimamente. A partir de esto, se han indagado varios parámetros que brinda información completa sobre la sanidad del suelo (Turmero, 2013).

Se conocen 3 ejes importantes que permiten determinar sobre la sanidad de un suelo. Estos ejes son las propiedades físicas, químicas y biológicas. Los parámetros físicos se centran en características de los suelos como macro y microporosidad, capacidad de retención de agua, la textura, la dureza, entre otros. Los parámetros químicos se centran en factores como los niveles de pH del suelo, nutrientes, acidez, entre otros. Por último, están los parámetros biológicos cuyo eje determina la actividad biológica de un suelo. Aquí se pueden encontrar la cantidad de proteínas, poblaciones de microorganismos o parámetros que se buscan implementar dentro de esta investigación como el carbón activo y la respiración basal (Moebius, et al, 2017).

La metodología de carbón activo o también conocida como POX-C, es un método donde se utiliza (KMnO₄) permanganato de potasio para la detección del carbón en los suelos. Este método se encuentra estrechamente relacionado con la cantidad de materia orgánica presente dentro de un suelo. Este, servirá como un alimento o fuente de energía para las comunidades microbianas, generando una red de alimento saludable. Esta metodología es una medida colorimétrica, por lo cual, cuando existe carbón activo dentro de los suelos, el permanganato de potasio provoca que exista oxidación de este mineral, produciéndose un cambio de color medible (Vásques & Paniagua, 2016).

Por otro lado, la respiración basal es un método que permite conocer la actividad metabólica que poseen las comunidades microbianas de los suelos. Este método se logra cuantificar por medio de la titulación del dióxido de carbono capturado de un suelo humedecido para reactivar el microbioma del suelo. Este parámetro nos permite conocer que al existir una mayor liberación de CO₂, existen comunidades microbianas mucho más activas dentro de los suelos de interés. Estos métodos, nos permiten conocer una sección importante de la sanidad del suelo por lo cual, aplicar estos métodos para comprender cuales son los efectos de utilizar biocidas es bastante relevante (Pardo, et al, 2019).

En base a esto, se busca investigar cuales son los efectos de aplicar biocidas en suelos del Ecuador y sus efectos sobre cultivos de importancia nacional. Dentro de nuestro país, la papa representa uno de los alimentos de gran importancia. Se conoce que aproximadamente se cultivan 300 mil toneladas de papa al año. Se ha reportado que en nuestro país existen un total de 400 variedades diferentes de papas, entre las cuales predominan variedades como el Gabriela y Superchola (Pumisacho & Sherwood, 2002). Lamentablemente Existen enfermedades como *Phytophthora infestans* que afectan a estos cultivos. Este patógeno, es un oomiceto el cual causa tizón tardío en la papa donde se observan manchas en las hojas, lesiones

en el tallo o afecciones a los tubérculos, causando la pérdida completa de los cultivos (Fry, 2008).

A partir de esta problemática, esta investigación tiene como objetivo principal evaluar los efectos de reducir la salud biológica del suelo por medio de biocidas y cómo afectan en el crecimiento y resistencia del patógeno *Phytophthora infestans* en cultivos de papa.

Así mismo, se implementaron 3 objetivos específicos que se desarrollarán a lo largo de este trabajo. El primero de ellos es optimizar el método POX-C, para determinar la cantidad de carbón activo presente en suelos de sierra ecuatoriana. El segundo objetivo planteado es entender cuáles son los efectos de aplicar tratamientos de biocidas en muestras de suelos y medir los cambios en la sanidad de los mismos por medio del POX-C y respiración basal. Como tercer y último objetivo tenemos evaluar el crecimiento de papa sembradas en suelos tratados con biocidas y su resistencia a *Phytophthora infestans*.

Los resultados obtenidos de esta investigación, demostraron que por medio de la estandarización de la metodología POX-C se puede analizar todos los suelos de la sierra ecuatoriana. Así mismo, la aplicación de biocidas tienen efectos tanto positivos como negativos con respecto a las medidas de sanidad del suelo. Para el caso del carbón activo todos los tratamientos demostraron un aumento de esta medida, pero al observar la respiración basal casi todos los tratamientos redujeron la tasa de respiración basal. Estos biocidas también demostraron que pueden llegar a ser útiles para promover el crecimiento de plantas si se utilizan de manera correcta, pero ninguno de estos biocidas generó resistencia a *Phytophthora infestans*. Estos resultados, ayudan a entender que realmente los biocidas no tiene efectos completamente negativos sobre los parámetros estudiados, por ende, un estudio intensivo de los efectos y uso correcto de los biocidas, pueden ser de gran ayuda para el sector agrícola.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología de POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana

Se realizó la estandarización de la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana. Para ello, se probó 3 masas de un suelo (1 g, 2,5 g y 5 g por triplicado) para comprobar sus efectos sobre las medidas de carbón activo. Una vez se determinó la masa a utilizar, se aplicó para suelos de 14 localidades de la sierra ecuatoriana, donde cada localidad presenta una muestra agrícola y una nativa, con la metodología detallada en Anexo 1.

2.2 Diseño experimental

Se utilizó suelo del páramo de Cayambe el cual se secó, tamizó con una malla de 2 m y pesó un total de 30 kg de suelo por cada tratamiento. Dicho suelo, se mezcló con 50% de peso en perlita y se llevó a macetas de plástico de 1L. Posteriormente se aplicó biocidas en las macetas y se separó un control obteniendo un total de 21 réplicas por tratamiento (Información biocidas Tabla 1). Se dejó acondicionar por 1 semana y se separó 3 réplicas de cada tratamiento para medir parámetros fisicoquímicos y biológicos. En el resto réplicas se cultivó papas de la variedad Superchola obtenidas por aeroponía, los cuales se sembró a 5 cm de profundidad en cada maceta. Se regó por 2 meses, hasta el óptimo desarrollo de la planta sin que llegue a etapa de floración.

2.3 Medición de parámetros fisicoquímicos y de sanidad del suelo

Para las medidas de pH y conductividad, se pesó 50 g de suelo y se mezcló con 100 ml de agua destilada. Se homogenizó bien por aproximadamente 2-5 minutos y luego se dejó reposar por 30 minutos, hasta obtener un sobrenadante. Una vez transcurrido este tiempo, se utilizó un

medidor marca Hanna modelo HI98129 para medir por triplicado los parámetros fisicoquímicos.

La metodología POX-C detallada en Anexo 1, fue aplicada para las muestras con biocidas y un control. Para la medida de respiración basal, se midió la actividad metabólica que poseen las comunidades microbianas de los suelos. Se cuantificó por medio de la titulación del dióxido de carbono capturado en las muestras de suelos tratados con biocidas. Para esto, se utilizó NaOH 1 molar, el cual luego de 96 horas se tituló por medio de HCL 0,05 molar y se calculó la tasa de respiración basal. Para más detalles revisar Anexo 2.

2.4 Medición de parámetros de crecimiento

El alto, se midió desde la base del tallo hasta la hoja más alta con una regla plástica 0,1 cm. El calibre, se utilizó un pie de rey digital marca Truper modelo Caldi-6MP 0,01 mm, para medir la base del tallo de la planta. El peso fresco se cortó desde la base del tallo y se pesó en una balanza de precisión 0,01 g. De estos parámetros se midió en total 18 muestras por cada tratamiento.

2.5 Medición de severidad de la infección

Dentro de una cámara húmeda se aplicó a 9 plantas por cada tratamiento con ayuda de un aerógrafo, 2 ml de una cepa de *Phytophthora infestans* obtenida del INIAP a una concentración 15000 esporangios por ml. Se mantuvo una humedad relativa alta para el crecimiento óptimo del patógeno, durante un total de 2 semanas. Luego, se evaluó la severidad de infección por medio de una escala visual previamente estandarizada por el INIAP. Se valoró de manera porcentual cada una de las plantas teniendo en total 9 réplicas para cada tratamiento.

2.6 Análisis de datos

Para todos los parámetros previamente analizados, se realizó gráficas en el programa Excel 2016 y los análisis estadísticos en Minitab 19. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y un análisis post-hoc de Tukey ($P < 0,005$) para obtener las diferencias significativas de los tratamientos, dentro de cada parámetro estudiado. También, se realizó una tabla con las diferencias relativas, de los distintos parámetros medidos respecto al control.

3. RESULTADOS

3.1 Estandarización de la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana

Se investigó cuáles son las diferencias significativas del uso de distintas masas de suelo y cómo afectan a la medición de suelos de la sierra ecuatoriana. Se observó que al utilizar 1g de suelo las medidas de carbón alcanzan valores de 1175 mg C/Kg de suelo, mientras que utilizando masas de 5g se observa medidas de carbón activo de 666 mg C/Kg de suelo (Figura 1a).

Para las medidas de carbón activo de la sierra ecuatoriana se observó que las medidas son muy variables (Figura 1b). En primer lugar, se debe mencionar que las muestras que se encuentran ordenadas de norte a sur, no presentan diferencias significativas. Por otro lado, la media carbón activo obtenidas por cada localidad si es significativamente diferente entre sí. Se destaca que la muestra de Cochapata tiene la mayor media de carbón activo con 1004,98 mg C/Kg de suelo, mientras que la muestra de Shical tiene la menor media con 264,98 mg C/Kg de suelo. Observando las muestras agrícolas en comparación a las nativas de cada localidad se observa que. si existen diferencias significativas entre sí, pero es difícil concluir sobre los mismos. La razón de esto es que suelos nativos como Shical y Urbina poseen casi el doble de carbón activo en comparación a su muestra agrícola. Mientras que muestras agrícolas como Cayambe o Pedregal tienen mayores medias comparadas con su muestra nativa, generando conflictos para concluir sobre sus diferencias. Como resultado de esto, se encontró que la masa óptima para la experimentación es de 2,5 g. Dadas las diferentes composiciones de los suelos de la sierra ecuatoriana es difícil concluir sobre las diferencias existentes con respecto al carbón activo.

3.2 Medidas de pH y conductividad para suelos tratados con biocidas

Se comprobó cuáles son los efectos con respecto al pH y conductividad de los suelos tratados con biocidas. Se encontró en las medias de pH que todos los tratamientos se encuentran dentro

de rangos 5 y 5,4 unidades (Figura 2a). Aquí se muestra que únicamente los tratamientos DAZ Y DCP tienen una media similar al control. El tratamiento FOP alcanza la mayor media de pH con 5,34 unidades. Mientras que tratamientos como KAS, COM Y PCB son muy similares entre sí pero significativamente mayores que el control. Con respecto a las medias de conductividad se observó que están dentro de un rango de 0,2 a 0,7 mS/cm (Figura 2b). Los tratamientos FOP, COM, PCB y KAS alcanzan una conductividad menor que el control por casi el doble. Por otro lado, tratamientos como el DAZ y DCP son significativamente mayores en comparación que el control. Aquí se destaca que DAZ tiene la conductividad más alta de todas con 0,62 mS/cm. En base a esto, los biocidas sí provocan variaciones en las medidas pH y conductividad, pero ninguna fuera de los rangos normales

3.3 Medidas de sanidad para suelos tratados con biocidas

Para investigar los cambios sobre la sanidad del suelo al aplicar tratamientos de biocidas se aplicaron 2 medidas de parámetros biológicos. En el caso de POX-C todos los tratamientos tienen una media mayor de carbón activo comparado con el control (Figura 3a). El tratamiento DCP posee casi el cuádruple de carbón comparados con el control con 962,28 mg C/Kg de suelo. Así mismo el DAZ posee más del doble de carbón activo con 610,25 mg C/Kg de suelo. Por último, se muestra que todos los demás tratamientos (FOP, COM, KAS Y PCB) tienen una media muy similar entre sí, pero siendo mayor que el control. Con respecto a las medias de respiración basal, se destaca que 1 tratamiento obtuvo una media mayor de respiración en comparación al control, 2 tratamiento son similares y los últimos 3 tratamientos tienen una media menor (Figura 3b). Aquí se destaca que el tratamiento DAZ posee la media de respiración más alta de todos los tratamientos con 0,59 mg CO₂ / h* g de suelo. Tanto el tratamiento COM y KAS poseen una media muy similar al control ya que no son significativamente diferentes al mismo, Por otro lado, los tratamientos KAS, PCB FOP y DCP,

son significativamente menores que control. Especialmente aquí se destaca que el DCP alcanza la media más baja de los tratamientos con $0,30 \text{ mg CO}_2 / \text{h}^* \text{ g}$ de suelo. En base a esto, todos los tratamientos presentan un incremento de las medidas de carbón activo mientras que, para respiración basal la mayoría de tratamientos disminuyen la actividad microbiana

3.4 Medidas de crecimiento para plantas cultivadas en suelos tratados con biocidas

Para investigar cuales son los efectos de suelos tratados con biocidas sobre el crecimiento de plantas de papa se aplicó 3 parámetros. Con respecto a la altura los tratamientos 3 tratamientos son significativamente mayores que el control, 2 tratamientos son similares y 1 es significativamente menor (Figura 4a). Se destaca que el DAZ alcanza la media más alta de crecimiento con 24,79 cm de altura mientras que el tratamiento KAS alcanza la media de altura más baja con tan solo 12,17 cm. Con respecto al promedio de ancho de tallo de planta de cada tratamiento se observó que 1 tratamiento es significativamente mayor al control, 2 tratamientos son iguales y 3 son significativamente menores (Figura 4b). De todos los tratamientos se destaca nuevamente el DAZ con un ancho de tallo de 3,24mm, mientras que el KAS alcanzó los 2,05 mm. Para el peso fresco por planta de cada tratamiento se observó destaca que únicamente 1 tratamiento es significativamente mayor, 4 son iguales al control y 1 es significativamente menor al control (Figura 3c). Nuevamente el tratamiento DAZ, alcanza un promedio de peso fresco de 6,77 g mientras que el tratamiento PCB tienen un promedio de tan solo 3,34 g. En base a esto, se puede mencionar que los biocidas en algunos casos si mejora el crecimiento de las plantas, pero en otros casos este se ve reducido significativamente.

3.5 Severidad de infección

Para investigar los efectos de suelos tratados con biocidas en plantas de papa, se midió la severidad de infección del patógeno utilizado. Ninguno de los tratamientos utilizados presenta diferencias significativas en comparación al control (Figura 5). Aun así, se debe destacar que

tanto el tratamiento COM como el PCB tienen una tendencia a reducir la severidad de infección. Por otro lado, los tratamientos KAS, DAZ DCP y FOP, tienen medias porcentuales muy similares al control. En base a esto, los biocidas realmente no presentan ningún tipo de resistencia al patógeno *Phytophthora infestans*.

4. DISCUSIÓN

4.1 Estandarización de la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana

La determinación de la masa y las características de suelo dentro de los experimentos, es uno de los aspectos cruciales para la obtención de resultados óptimos. Se ha observado que distintas masas de suelo pueden arrojar medidas mayores o menores de carbón activo (Figura 1a). Así mismo, características propias de los suelos generan que exista una gran variabilidad en estas medidas. A pesar de que existan condiciones óptimas para suelos de la sierra ecuatoriana, pueden llegar a no ser aplicables en otro tipo de suelos a nivel nacional o mundial ya que cada uno presenta características distintas que pueden provocar medidas muy variables entre sí. Por esta razón un estudio intensivo de las diferentes características del suelo es esencial para comprender los efectos sobre este parámetro de sanidad.

En base a otros estudios realizados se observó que existen características importantes al momento de realizar este parámetro de sanidad de suelo. Se destaca el nivel de tamizado, la utilización de suelos completamente secos, el tiempo de agitación, composición, entre otros. La unión de todos estos parámetros demuestra que condiciones óptimas para que exista una correcta medición de carbón activo dentro de rangos teóricos (0 a 1440 mg *C/Kg de suelo), es utilizando suelo seco con una masa de 2,5 g. Gracias a esto, se permite que las mediciones sean lo más reales posibles, ya que la interacción del suelo con los respectivos reactivos, se genera de una manera óptima (Pulleman , et al, 2021).

Esto se pudo evidenciar al aplicar la metodología POX-C en suelos de la sierra ecuatoriana (Figura 2b). Se observó que todos los suelos entraron dentro de los rangos medibles, pero debido a las distintas características que presentan los suelos como cantidad de nutrientes, composición, contenido de materia orgánica, tipo de suelo, entre otros, generó que las medidas de carbón activo fueran bastante variables. No se observó que exista una tendencia a tener

mayor o menor carbón activo al medir los suelos del norte a sur. Así mismo observar desde la perspectiva de suelos agrícolas vs nativos se observaron variaciones en las medidas de carbón activo. Esto se explica ya que la utilización constante de productos químicos en suelos agrícolas puede afectar directamente a la sanidad de suelo de una manera bastante variable, así mismo los suelos nativos debido a su composición provocan estas medidas tan variables (Loyza, et al, 2020).

4.2 Efectos de suelos tratados con biocidas en parámetros de sanidad, crecimiento y resistencia a *Phytophthora infestans*

Con respecto a los parámetros de sanidad y crecimiento de plantas de papa en suelos tratados con biocidas se observó una gran variedad de resultados. Los biocidas en general, si reducen la sanidad del suelo. Se observó que a pesar de que aumentan las medidas de POX-C, en la respiración basal se ve una clara reducción de la actividad microbiana (Tabla 2). Se ha reportado que esta variación en ambos parámetros se encuentra dada por la composición y efectos de los biocidas. Algunos de ellos permiten que exista mejor disponibilidad de nutrientes y otros en su composición tienen compuestos con carbón. Con respecto a la respiración, todos los biocidas afectan directamente a plagas, hongos, bacterias, entre otros reduciendo la actividad microbiana y, por ende, genera alteraciones en la tasa de respiración (Patiño, et al, 2018). Así mismo existen biocidas que afectan a ciertos parámetros de crecimiento ya sea positiva o negativamente, esto de igual manera se explica a la disponibilidad de nutrientes y la presencia de comunidades microbianas que persisten luego de los tratamientos de biocidas.

Uno de los tratamientos que se destacan de todos los demás en estos parámetros es el DAZ (Figura 3). Este biocida presenta un incremento de las medidas de sanidad de suelo y de crecimiento. DAZ durante su proceso de acción, libera gases que genera una mejora de la

disponibilidad y asimilación de minerales como calcio, potasio, fósforo, carbón, entre otros por parte del suelo, de la planta y de los microorganismos presentes (Chuen, et al, 2012). Se ha reportado que esto genera la activación de bacterias nitrificantes, aumentando así procesos de nitrificación. Se permite la liberación de compuestos nutritivos como el NH_4^+ , SO_4^- , HCO_3^- , NO_3^- aprovechables para la planta provocando los efectos de crecimiento observados con este tratamiento (Figura 4) (Whensheng, et al, 2018). Este conjunto de compuestos y minerales generados por el uso del DAZ permiten que exista un incremento de las medidas de carbón activo. Por otro lado, debido a sus efectos desinfectantes el biocida DAZ destruye gran cantidad de microorganismos, específicamente a eucariotas, pero existen otros microorganismos que son capaces de sobrevivir y mantener una actividad metabólica elevada, como se observó en las medidas de respiración (Nicola, et al, 2017).

Otro de los biocidas relevantes fue el DCP. Este biocida, posee una misma tendencia que el biocida DAZ, a excepción del parámetro de respiración el cual, sí se vio reducido significativamente en comparación al control (Figura 3). Se ha reportado que el DCP, en su composición tiene cloropicrina, esta es una molécula de carbono que tiene una difusión rápida en los suelos (Cebolla & Serrano, 2010). Debido a este componente, se presenta un aumento en los niveles de carbono como se observó dentro de este parámetro. Además, existe una clara reducción de la respiración basal lo cual se explica por las características no selectivas de este componente. Por ende, existe una disminución del microbioma presente en los suelos y en consecuencia la actividad microbiana (Hernández & Sánchez, 2018).

Con respecto al tercer biocida que presentó variaciones en los distintos parámetros medidos, está el KAS. Al igual que los demás biocidas, el aumento de los niveles de carbón activo está dado por la composición del biocida (Figura 3a). Con respecto a la respiración se ha reportado que este biocida al tener propiedades fungicidas y bactericidas reduce una gran cantidad de

microorganismos esenciales para el crecimiento de las plantas. Por esta razón, las relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos se ven afectadas provocando que la asimilación de nutrientes presentes en los suelos como el nitrógeno, magnesio, calcio, entre otros, se vean reducidas y por ende, las plantas no puedan crecer de manera óptima (Figura 4) (Mostacero, 2019).

Con respecto a la severidad, se observó que ninguno de los tratamientos tuvo una diferencia significativa en comparación al control (Figura 5). Se ha encontrado que la reducción del microbioma del suelo, genera que las relaciones plantas-microorganismos existentes afecten a la resistencia a enfermedades. Esto se puede evidenciar en tratamientos como KAS, DAZ y el DCP los cuales tienen una tendencia mayor a ser susceptibles a enfermedades. Se puede inferir que se redujeron las comunidades microbianas y, por ende, también se redujeron las interacciones benéficas con la planta (Cebolla & Serrano, 2010).

Con referencia a lo reportado en este trabajo, se considera que es importante realizar estudios con mayor profundidad de parámetros físico, químicos y biológicos que permitan determinar con mayor amplitud sobre los efectos de los biocidas sobre el suelo. Así mismo un estudio del microbioma, permitirá conocer cuáles son los organismos benéficos que permiten que existan variaciones en el crecimiento e incluso conocer cuales pueden llegar a ser esenciales para la resistencia contra patógenos.

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones de este trabajo, observamos que la estandarización para los suelos de la sierra ecuatoriana si fue efectiva. Cabe mencionar que, si se busca llevar estas mediciones a otro tipo de suelos tanto del Ecuador como de otros países, se deben realizar más estudios sobre la composición del suelo ya que pueden arrojar valores fuera de los rangos medibles. Con respecto a la sanidad del suelo, en todos los tratamientos se observó un aumento del carbón activo desde 55 a 255% en comparación al control. Por otro lado, para respiración basal se observa que tratamientos como el DCP, FOP, PCB y KAS tienen una reducción desde 3 a 39%. En otros casos como el DAS y COM se observó un ligero aumento de 4 a 7%. Así mismo tiene una gran cantidad de efectos sobre el crecimiento pues algunos tratamientos biocidas. Ejemplos como el DAZ y el DCP generaron un aumento en el crecimiento de hasta el 54% en referencia al control. Así mismo, otros tratamientos como el KAS presentaron una reducción del crecimiento de hasta el 24%. Estos resultados están dados por los efectos de los biocidas ya que permiten tener una mayor disponibilidad los nutrientes ya existentes en los suelos, otros biocidas provocan una reducción del microbioma que es esencial para que existan procesos biológicos que ayuden a la planta a desarrollarse. Por último, la aplicación de biocidas realmente no presenta ningún efecto positivo sobre la resistencia del patógeno *Phytophthora infestans*. En casos como el DAZ, DCP, FOP y KAS se obtuvo una severidad de infección de aproximadamente 8-15%. En consecuencia, estos tratamientos provocan que las plantas sean más susceptibles a enfermarse y por ende generar la pérdida del cultivo. Por esta razón, es importante continuar investigando más a fondo sobre los efectos de la aplicación de biocidas, buscar nuevas alternativas para evitar este tipo de enfermedades que afectan a los cultivos de papa en el Ecuador y cómo afectan a la sanidad en los diferentes parámetros físicos, químicos y biológicos.

6. TABLAS

Tabla 1. Información básica de biocidas , con las dosis y codificaciones utilizadas.

Ingrediente Activo	Función	Dosis utilizada por maceta	Método de aplicación	Codificación
Dazomet	Desinfectante de suelos	1,24 g	Directa en suelo	DAZ
Dicloropropeno + Cloropicrina	Insecticida – nematocida - fungicida no selectivo y de contacto	2,46 ml	Vapor de agua	DCP
Cimoxanilo + oxiclورو de cobre + mancozeb	Fungicida de contacto y sistémico	0,095 g	Dilución en agua	COM
Fosetyl + propamocarb	Fungicida de contacto	0,031 ml	Dilución en agua	FOP
Pentacloronitrobenceno	Fungicida de contacto para suelos y semillas	0,062 g	Dilución en agua	PCB
Kasugamicina	Fungicida y bactericida sistémico	10,7 ml	Dilución en agua	KAS

Tabla 2. Diferencias relativas de todos los parámetros medidos en plantas de papa y suelos tratados con biocidas. Se encuentran separados por funciones muy similares entre sí.

Tratamiento	Análisis Químicos		Sanidad de suelo		Crecimiento			Resistencia
	pH	Conductividad	Carbón activo	Respiración basal	Alto de planta	Calibre de planta	Peso fresco de planta	Severidad
DAS	-0,32% ^c	82,35% ^a	125,71% ^a	7,71% ^a	54,34% ^a	12,69% ^c	23,24% ^a	9,25% ^c
DCP	1,17% ^c	20,58% ^a	255,91% ^a	-39,26% ^b	16,43% ^c	7,86% ^c	-2,44% ^c	7,40% ^c
COM	3,99% ^a	-36,27% ^b	68,16% ^a	4,42% ^c	20,06% ^a	-2,53% ^c	-8,77% ^c	-18,51% ^c
FOP	4,90% ^a	-32,35% ^b	84,48% ^a	-22,48% ^b	-2,45% ^c	-7,39% ^c	-6,33% ^c	5,55% ^c
PCB	2,87% ^a	-50,98% ^b	55,10% ^a	-16,91% ^b	8,04% ^c	-8,90% ^c	-39,23% ^b	-31,48% ^c
KAS	4,38% ^a	-50,98% ^b	64,08% ^a	-3,55% ^c	-24,22% ^b	-28,83% ^b	-13,55% ^c	14,81% ^c

^a Existe un aumento significativo en comparación al control

^b Existe una reducción significativa comparación al control

^c No presenta diferencias significativas en comparación al control

7. FIGURAS

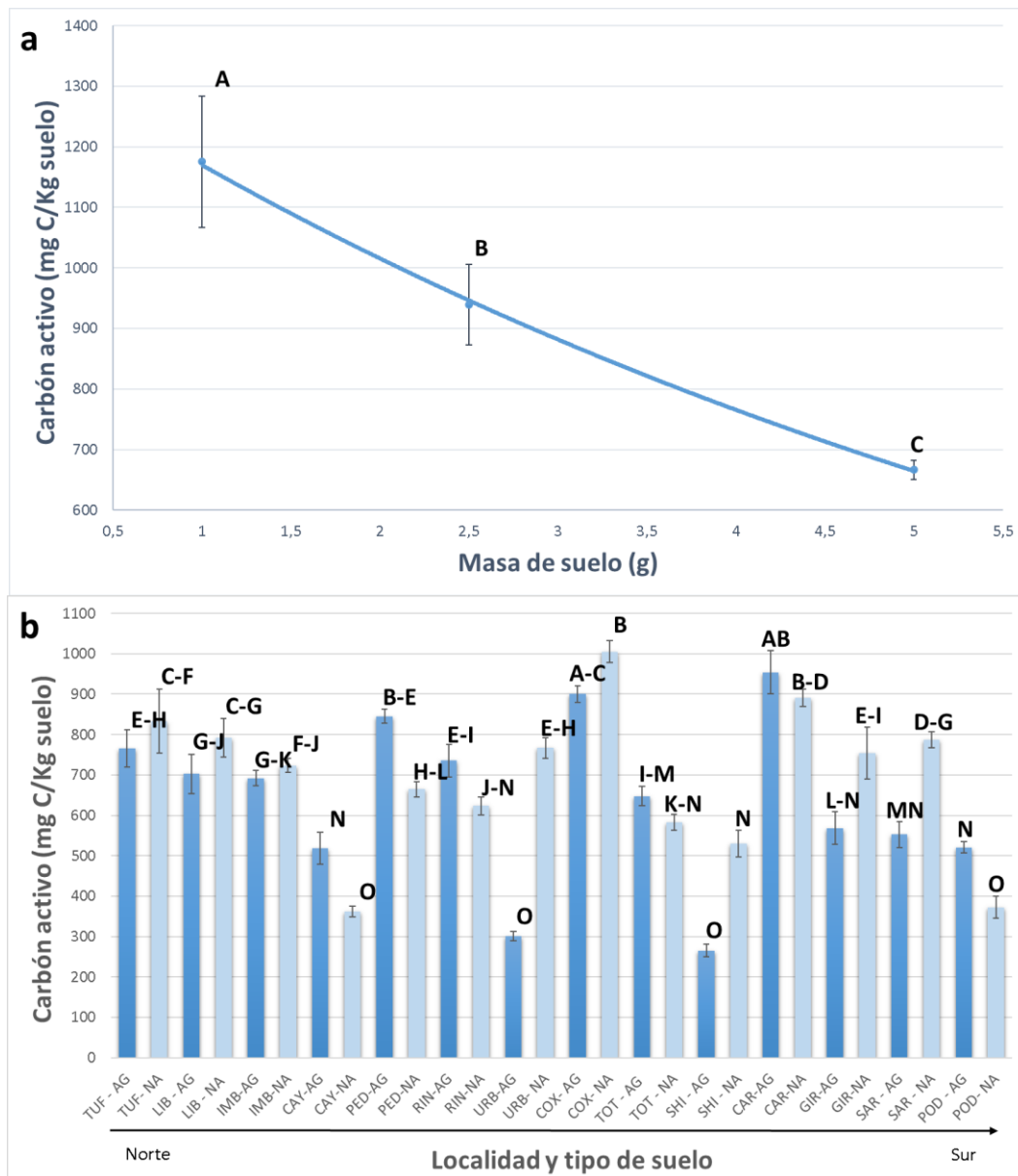


Figura 1. Estandarización de la metodología POX-C con suelos de la sierra ecuatoriana

(a) Diferencias de masas de suelo del páramo de Cayambe, para medir el carbón activo. (b) Medias de carbón activo obtenidas en 14 localidades de la sierra ecuatoriana, las cuales se encuentran subdivididas en muestras nativas y agrícolas. Adicionalmente están ordenadas de norte a sur, siguiendo la geografía ecuatoriana. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$ réplicas de cada muestra). Las diferentes letras indican la significancia estadística determinada por ANOVA y una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

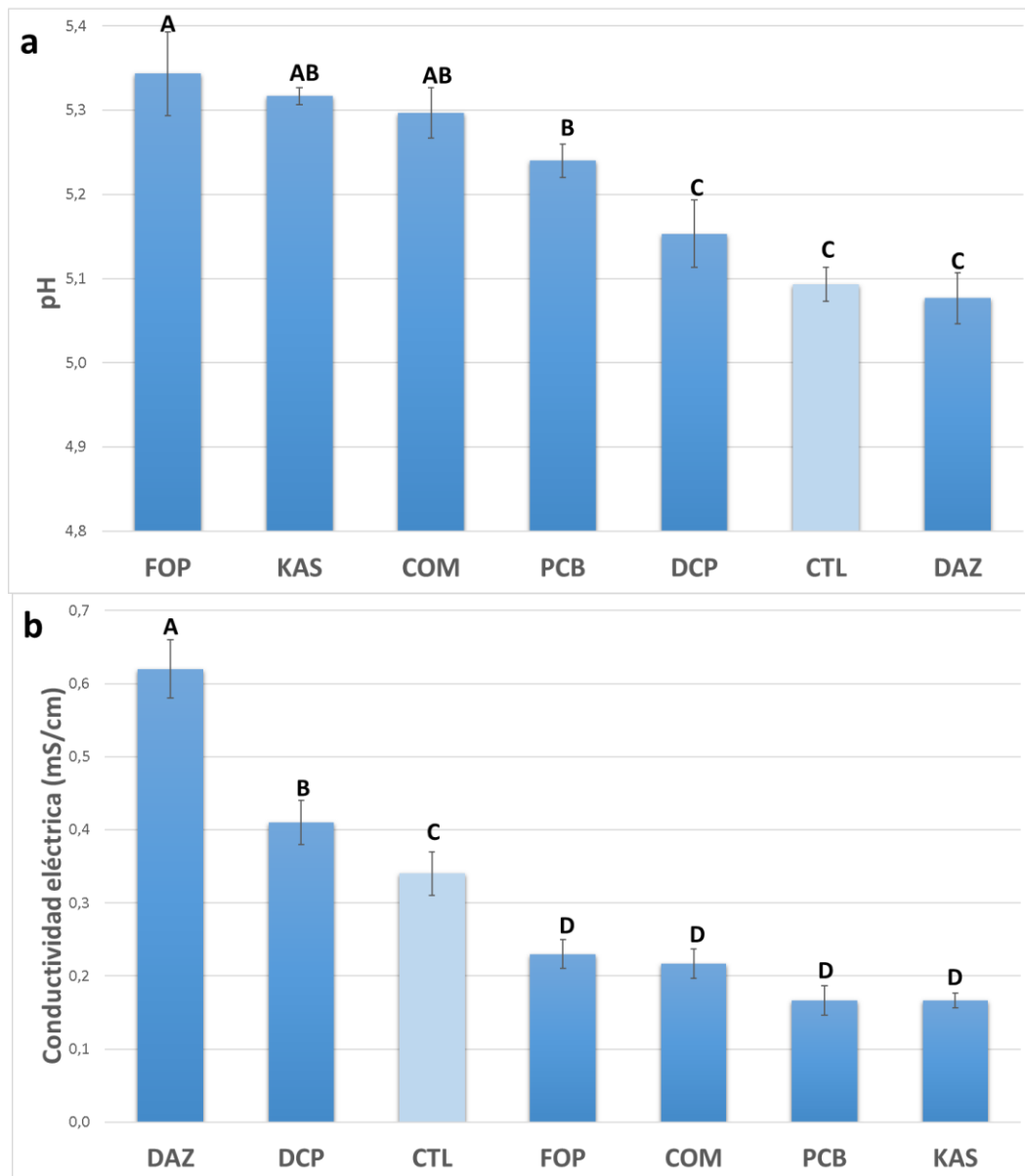


Figura 2. Media para pH y conductividad de suelos con tratamientos de biocidas

(a) Medias de pH y (b) conductividad eléctrica obtenidas de suelos tratados con biocidas. Las barras de error muestran la desviación estándar ($n = 3$ réplicas de cada tratamiento). Las diferentes letras indican la significancia estadística determinada por ANOVA y una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

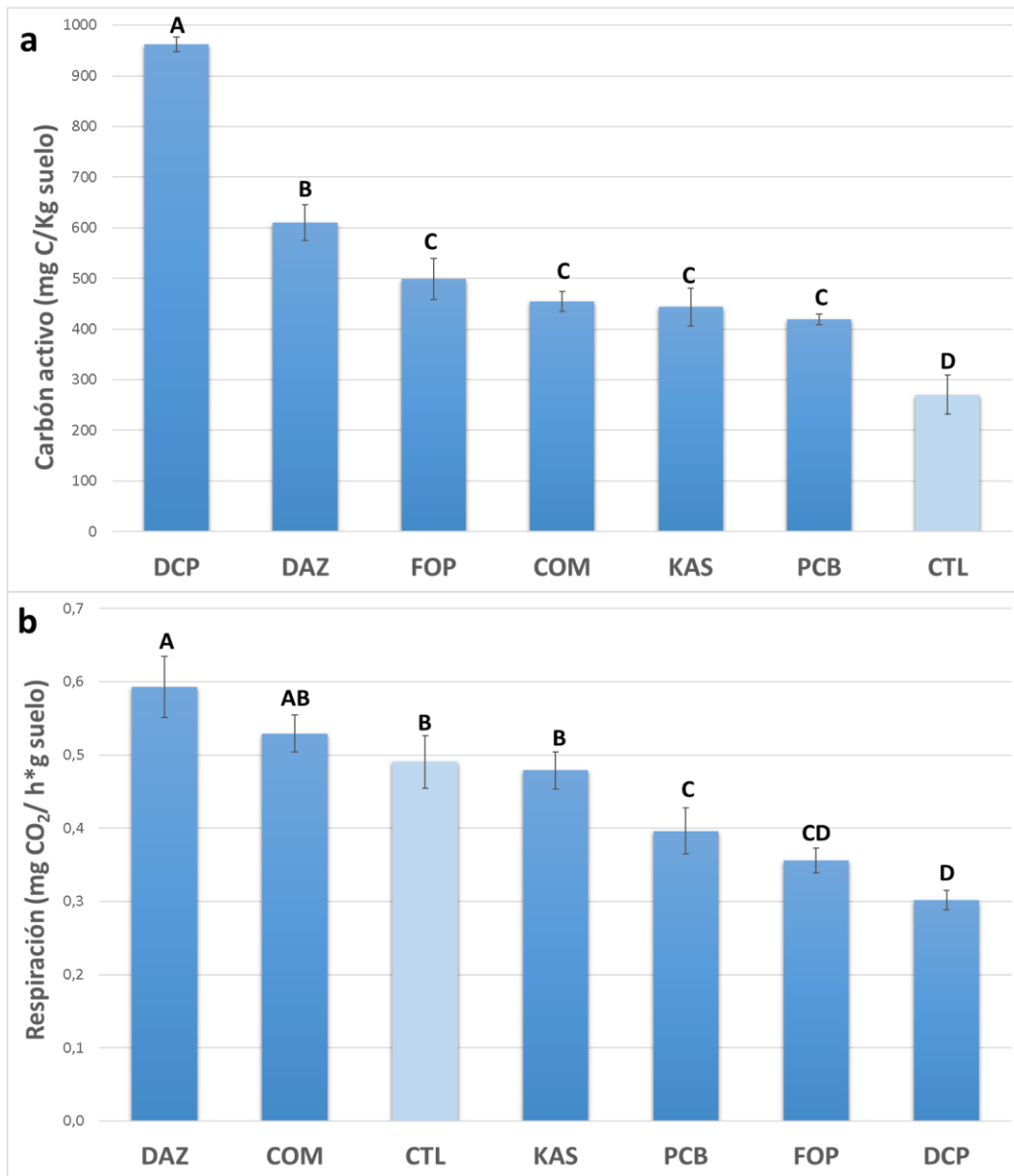


Figura 3. Media de parámetros de sanidad de suelo para muestras con tratamientos de biocidas

(a) Medias de carbón activo y (b) Respiración basal obtenidas para muestras de suelo tratados con biocidas. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 3 réplicas de cada tratamiento). Las diferentes letras indican la significancia estadística determinada por ANOVA y una prueba de Tukey (P < 0,05).

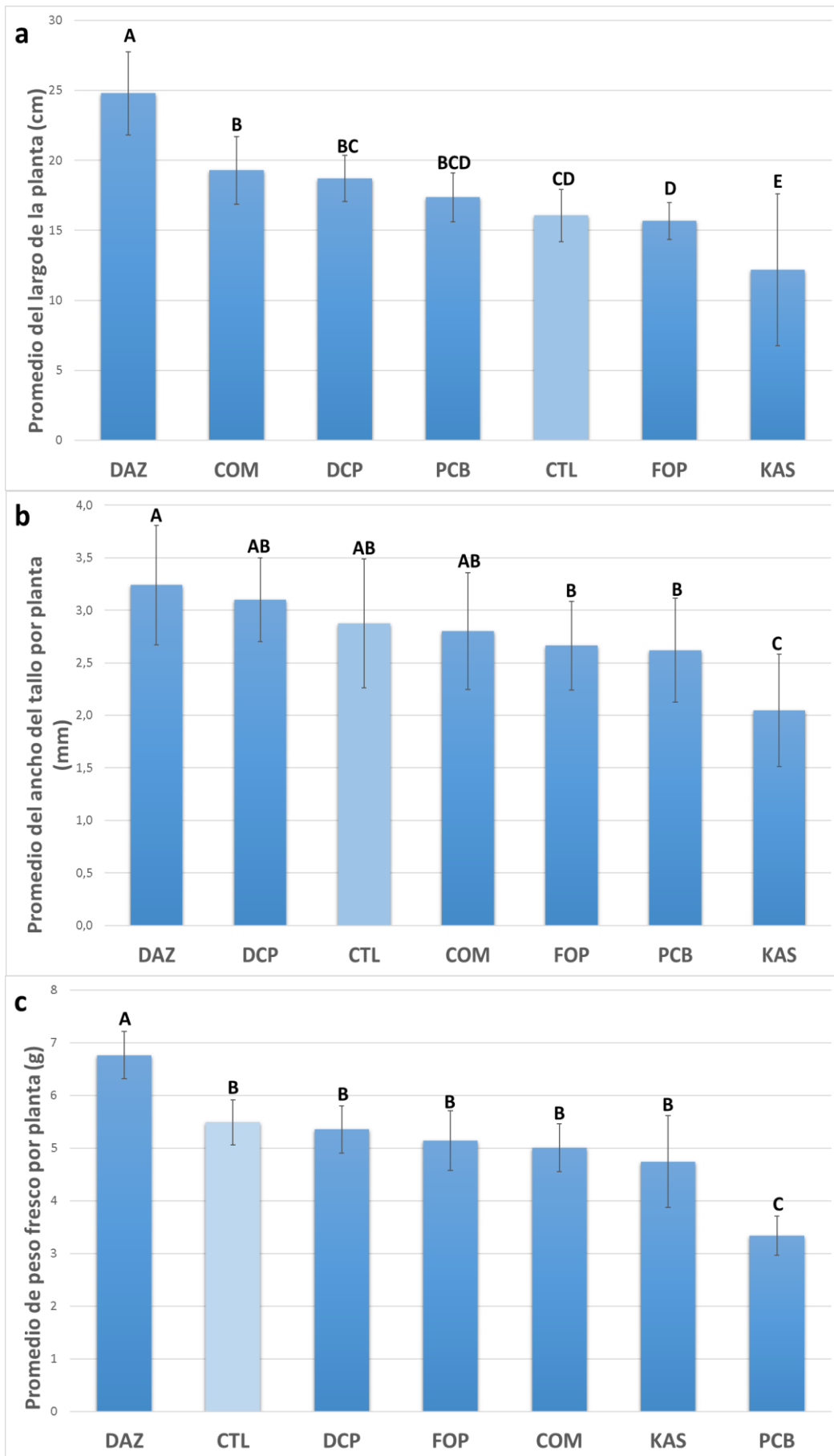


Figura 4. Media de crecimiento para plantas de papa cultivadas en suelos tratados con biocidas

(a) Media de altura, (b) calibre, y (c) peso fresco obtenidas de plantas de papa cultivadas en suelos tratados con biocidas. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 9 réplicas de cada tratamiento). Las diferentes letras indican la significancia estadística determinada por ANOVA y una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

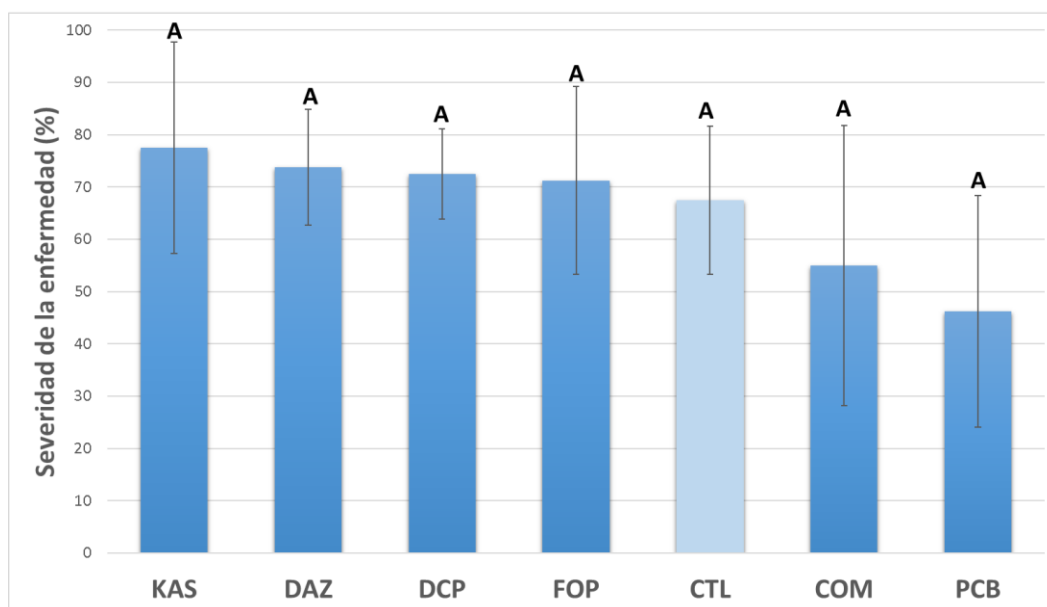


Figura 5. Media de severidad para plantas de papa infectadas con *Phytophthora infestans*

Media de severidad obtenida de plantas de papa cultivadas en muestras de suelo tratados con biocidas, e infectadas con el patógeno *Phytophthora infestans*. Las barras de error muestran la desviación estándar (n = 9 réplicas de cada tratamiento). Las diferentes letras indican la significancia estadística determinada por ANOVA y una prueba de Tukey ($P < 0,05$).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Burbano, H. (2017). La calidad y salud del suelo influyen sobre la naturaleza y la sociedad.

Tendencias, 18(1), 118-126.

Cebolla, V. & Serrano, F. Soil Disinfestation Treatments with 1,3-Dichloropropene and

Chloropicrin under Low Temperature Conditions for Strawberry Mother Plants. *Pro vegetal & biotechnology* (883), 121-128.

Chuen, H., Yuan, B., Tschu, T., Kai, H. & Wei-Tse, H. Evaluation of dazomet as fumigant

for the control of brown root rot disease. *Pest Management Science* 68 (7), 959-962.

Fry, W. (2008). Phytophthora infestans: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular plant*

pathology. 9(3), 385-402.

Hérrnandez, A. & Sánchez, A. (2018). Alternativas ambientalmente inocuas para el control de

nemátodos formadores de agallas (Meloidogyne spp.) en casas de cultivo. *Científico estudiantil Ciencias Forestales y Ambientales*. 3(1), 114-122

Loayza, N. V., Sevilla, V., Olivera, C., Guevara, M., Olmedo, G., Vargas, R., Oyonarte, C.,

& Jiménez, W. (2020). Mapeo digital de carbono orgánico en suelos de Ecuador.

Ecosistemas, 29(2), 18-52.

Moebius, B., Moebius, D., Gugino, B., Idowu, O., Schindelbeck, R., Ristow, A., Van, H.,

Thies, J., Shaylet, H., McBride, M., Kurtiz, K., Wolfe, D. & Abawi, G. (2017).

Comprehensive Assessment of Soil Health (3era ed). New York.

Mostacero, I. (2019). Efecto de diferentes ingredientes activos para el control de Pyricularia

grisea en arroz (*Oryza sativa* L.), valle Santa. Obtenido el 15 de diciembre 2021 de

http://repositorio.usanpedro.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/15315/Tesis_63788.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Nicola, L., Turco, E., Albanese, D., Donati, C., Thalheimer, M., Pindo, M., Insam, H., Cavalieri, D. & Perlot, I. Fumigation with dazomet modifies soil microbiota in apple orchards affected by replant disease. *Applied soil Ecology* 133(3), 71,79.
- Pardo, P., Gómez, P. & Guevara, C. (2019). Biomasa microbiana y respiración basal del suelo bajo sistemas agroforestales con cultivos de café. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1), 1-8.
- Patiño, D., Pérez, L., Torres, M., Rosas, &., Filippo, G. (2018). Uso de biocidas y mecanismos de respuesta bacteriana *Revista cubana de investigaciones* 37(3), 1-17.
- Pulleman, M., Will, S., Creamer, R., Dick, R., Ferguson, R., Hooper, D., Williams, C. & Margenot, A. (2021). Soil mass and grind size used for sample homogenization strongly affect permanganate-oxidizable carbon (POXC) values, with implications for its use as a national soil health indicator. *Geoderma*, 1-11
- Pumisacho, M. & Sherwood, S. (2002). El cultivo de la papa en Ecuador. Quito: Abya Yala.
- Turmero, A. (2013). Análisis del efecto del fuego y de la presencia de contaminantes sobre la actividad y biodiversidad microbiana del suelo. Obtenido el 16 de diciembre 2021 de <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/20302>.
- Vásquez, M. & Paniagua, F. comparación de dos técnicas para la determinación de carbono orgánico del suelo, en el lafqa departamento de química, unanmanagua, septiembre-diciembre, 2015. Obtenido el 16 de diciembre 2021 de <https://repositorio.unan.edu.ni/2722/1/71958.pdf>

Weil, R., Islam, K., Stine, M., Gruver, J. & Samson, S. (2009). Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *Renewable agriculture and food systems*. 18(1), 3-17.

Whensheng, F., Dongdong, Y., Xianli, W., Bin, H., Xiaoning W., Jie, L., Xiaoman, L., Yuan, L., Canbin, O., Qiuxia, W. & Aocheng, C. (2018). Responses of Nitrogen-Cycling Microorganisms to Dazomet Fumigation. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-13.

ANEXO 1: PROTOCOLO DETALLADO ESTANDARIZACIÓN DE METODOLOGÍA POX-C

Preparación de reactivo

Para preparar el reactivo permanganato de potasio, se pesó primero 147 g de CaCl_2 en un vaso de precipitación con 900 mL de agua destilada y se mezcló. Posteriormente con ayuda de una probeta graduada se aforó hasta 1000 mL con agua destilada. Posteriormente se pesó 31.60 g de KMnO_4 en un vaso de precipitación con 900 mL de la solución de CaCl_2 previamente realizada. Se llevó a una placa de agitación y con ayuda de calor suave se disolvió y homogeneizó el reactivo. Una vez completa la solución, se midió el pH y se ajustó 7.2 unidades con NaOH 0.1 Molar. Posteriormente se aforó hasta llegar a 1000 mL con la solución de CaCl_2 y se almacenó en una botella de vidrio ámbar con la finalidad de que la solución sea estable hasta 3 a 6 meses (Weil, et al, 2009).

Preparación de estándares

Se preparó 4 estándares a diferentes concentraciones para esto, se midió 10 ml de agua destilada en un balón aforado y se colocó en 1 vial ámbar de 10 ml (4 en total). Posteriormente con ayuda de una micropipeta se retiró 250 μl del primer frasco, 500 μl del segundo frasco, 750 μl del tercer frasco y 1000 μl del último frasco. Luego se colocó reactivo (KMnO_4) en las mismas cantidades retiradas previamente para el frasco que corresponda. Por último, se homogeneizó levemente los frascos y se almacenó en sombra hasta su uso. Nota: Estos frascos, tienen una

duración de hasta 3 días bajo las condiciones de almacenamiento mencionadas (Weil, et al, 2009).

Preparación de las diluciones de soluciones madre

Se llenó 4 tubos falcón con 50ml de agua destilada, con ayuda de un balón aforado de 50ml. Para la preparación de las diluciones, se extrajo 500 µl de agua destilada de cada tubo. Se colocó 500 µl de cada estándar realizado en cada tubo. Es decir, se colocó 500 µl del primer estándar en el primer tubo falcón, 500 µl del primer estándar en el segundo tubo y así sucesivamente (Weil, et al, 2009).

Preparación de la reacción

Se tomó una masa de 2,5 gramos de suelo y se colocó en un tubo falcón de 50 ml, con 2 ml de permanganato de potasio (KMnO₄) y 18 ml de agua destilada. Se agitó manualmente por 2 minutos y luego se dejó reposar por 10 minutos más con la tapa abierta. Pasado este tiempo, se tomó 500 µl del sobrenadante y se colocó nuevamente en un nuevo tubo falcón con 49,5 ml de agua destilada para realizar una dilución 1:10. Posteriormente, se llevó esta dilución a medir en el espectrofotómetro a 550 nm (Weil, et al, 2009).

Cálculo de la masa de carbón activo

Se aplicó la siguiente fórmula para realizar los respectivos cálculos

$$POXC(\text{mg Kg}^{-1}) = \left[0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} - (a + b \times \text{ABS}) \right] \times \left(9000 \text{ mg} \frac{\text{C}}{\text{mol}} \right) \times \left(0,02 \text{ L} \frac{\text{solución}}{\text{wt}} \right)$$

Dónde:

- 0,02 mol /L = concentración de solución inicial
- a = intersección de la curva estándar

- b = pendiente de la curva estándar
- ABS = absorbancia desconocida
- 9000 = miligramos de carbono oxidado por 1 mol de MnO_4 cambiando de Mn^{7+} a Mn^{2+}
- $0,02\text{ L}$ = volumen de solución madre reaccionada
- Wt = peso de la muestra de suelo secada al aire en kg

ANEXO 2: METODOLOGÍA DE RESPIRACIÓN BASAL

Procedimiento

Se preparó una incubadora para cada tratamiento. Para esto, se coloca en el fondo de un frasco de vidrio con tapa hermética, un papel filtro humedecido con 15 ml de agua. Posteriormente, se colocó un plato de aluminio con 9 perforaciones encima del papel filtro. Se pesó 20 gramos de cada tratamiento, se mezcló con perlita y se colocó sobre el plato de aluminio. Sobre esto, se colocó una mesa de plástico con un vaso de precipitación de 10 ml que contiene 5 ml de NaOH 1 molar (Moebius, et al, 2017).

Se cerró la incubadora y se dejó reposar por 96 horas. Una vez transcurrió el tiempo, se retiró el vaso de precipitación de la incubadora y se colocó 4 ml de BaCl₂ 0,05 molar para precipitar la solución a carbonato de bario. Finalmente, se colocó 4 gotas de fenolftaleína y se procedió a titular con HCl 0,05 molar. Los valores obtenidos de la titulación se utilizaron para realizar los respectivos cálculos. Se debe mencionar que ambos parámetros de sanidad de suelo, se midieron por triplicado para cada tratamiento realizado (Moebius, et al, 2017).

Cálculo de la tasa de respiración

Se aplicó la siguiente fórmula para realizar los respectivos cálculos

$$BAS = \frac{M_c \times (V_b - V_s) \times 0,05}{S_{dw} \times t \times 2} \times 10^3$$

Dónde:

- M_c = Peso molar del carbono ($M_w = 12.01$)
- V_b = Volumen en ml, de HCl 0,05 M consumido en la titulación de los blancos
- V_s = Volumen en ml, de HCl 0,05 M consumido en la titulación de la muestra

- S_{dw} = es un gramo de peso seco de tierra
- t = es el tiempo de incubación en horas