



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES
CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO
(O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN
MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL
CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024”**

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Ingeniera Ambiental

Autor:

Guzmán Gallardo Stefany Gabriela

Tutor:

Rivera Moreno Marco Antonio

LATACUNGA – ECUADOR

Febrero 2024

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Guzmán Gallardo Stefany Gabriela, con cédula de ciudadanía No. 1755014105, declaro ser autora del presente Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024”**, siendo el Ingeniero Mg. Marco Antonio Rivera Moreno, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 23 de febrero del 2024



Stefany Gabriela Guzmán Gallardo

C.C: 1755014105

ESTUDIANTE

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **GUZMAN GALLARDO STEFANY GABRIELA**, identificada con cédula de ciudadanía **1755014105** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Ambiente, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “**EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024**”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico

Inicio de la carrera: Octubre 2019 - Marzo 2020

Finalización de la carrera: Octubre 2023 – Marzo 2024

Aprobación en Consejo Directivo: 25 de Mayo del 2023

Tutor: Ing. Marco Antonio Rivera Moreno, Mg.

Tema: “**EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024**”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.

- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
- d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
- e) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 23 días del mes de febrero del 2024.



Stefany Gabriela Guzmán Gallardo

LA CEDENTE

Dra. Idalia Pacheco Tigselema, Ph.D.

LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024”, de Guzmán Gallardo Stefany Gabriela, de la carrera de Ingeniería Ambiental, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la pre-defensa.

Latacunga, 23 de febrero del 2024



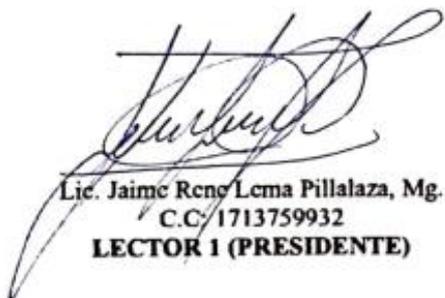
Ing. Marco Antonio Rivera Moreno, Mg.
C.C: 0501518955
DOCENTE TUTOR

AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN

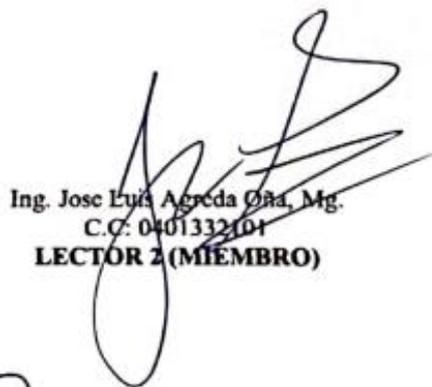
En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Guzmán Gallardo Stefany Gabriela, con el título del Proyecto de Investigación: **“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza grabar los archivos correspondientes en un CD, según la normativa institucional.

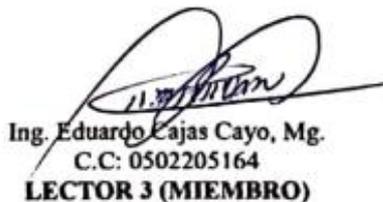
Latacunga, 23 de febrero del 2024



Lic. Jaime Rene Lema Pillalaza, Mg.
C.C: 1713759932
LECTOR 1 (PRESIDENTE)



Ing. Jose Luis Agreda Oña, Mg.
C.C: 0401332101
LECTOR 2 (MIEMBRO)



Ing. Eduardo Cajas Cayo, Mg.
C.C: 0502205164
LECTOR 3 (MIEMBRO)

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Dios por el regalo de la vida, la salud y la fortaleza que me ha brindado para dar lo mejor de mi cada día durante mi trayectoria estudiantil.

A mi madre, quien ha sido mi mayor fuente de apoyo y motivación a lo largo de este camino. Su amor incondicional y dedicación incansable han sido pilares fundamentales en mi formación y desarrollo, logrando alcanzar con esta nueva meta en mi vida.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, a todas las autoridades que dirigen esta Institución y a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos en las diferentes asignaturas durante el desarrollo de la carrera

A mi tutor, Ing. Marco Rivera por guiarme durante el desarrollo de mi proyecto de titulación, por su paciencia, por su valioso tiempo y consejos.

A mis hermanos, compañeros y amigos, quienes estuvieron acompañándome a lo largo de esta travesía académica.

¡Gracias a todos!

Stefany Gabriela Guzmán Gallardo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, cuyo amor incondicional, apoyo constante y sacrificio han sido la fuente de inspiración y fortaleza a lo largo de este viaje académico. También dedico este logro a mis seres queridos y amigos, cuyo aliento y ánimo han sido un faro de luz en momentos difíciles.

Stefany Gabriela Guzmán Gallardo

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES Y DOS FRECUENCIAS DE OZONO (O₃) PARA EL CONTROL DEL HONGO *Fusarium* EN MEDIOS DE CULTIVO EN EL LABORATORIO DEL CAMPUS SALACHE, PERIODO 2023 - 2024”.

Autor:

Guzmán Gallardo Stefany Gabriela

RESUMEN

La investigación se realizó en el Centro de Experimentación Académico Salache (CEASA) perteneciente a la Universidad Técnica de Cotopaxi. Con el objetivo de evaluar la concentración y la frecuencia de aplicación de Ozono (O₃) para el control del hongo *fusarium oxysporum sp.* en condiciones in vitro. Se implementó un arreglo factorial AXB, los factores evaluados fueron 6 tratamientos con 4 repeticiones y un testigo, se implementó una caja Petri por tratamiento con un total de 24 unidades experimentales. Para obtener el *fusarium oxysporum sp.*, se realizó un aislamiento a partir de material vegetal infectado, obteniendo un hongo purificado en la aplicación de las 3 concentraciones y 2 frecuencias de ozono (O₃), como metodología se realizaron dos ensayos para la aplicación del agua ozonizada: al borde del micelio al quinto día de crecimiento y al medio de cultivo (PDA), con un testigo; se registró el crecimiento micelial diario a partir de la primera aplicación de agua ozonizada hasta finalizar los ensayos, se realizó el ADEVA de los datos obtenidos en Excel e Infostat para su verificación. Los resultados de la investigación fueron: los T6 de los dos ensayos, con una concentración de 0,54 ppm con dos frecuencias de aplicación, fueron los que presentaron menor crecimiento diametral entre los tratamientos, teniendo un crecimiento promedio del micelio de 6.41 y 6.33 cm, respectivamente. Para la tasa de crecimiento promedio se obtuvieron resultados de 0.23 y 0.22 cm/día, respectivamente. Los resultados muestran que no existió una diferencia estadística significativa para las variables concentración y frecuencia. Sin embargo, el análisis del Testigo vs. Tratamientos muestra una diferencia estadística en cuanto a la tasa de crecimiento promedio del micelio (cm/día). El efecto logrado por la mayor concentración (0.54 ppm) y frecuencia (2 aplicaciones) se diferenció estadísticamente del testigo sin aplicación. Finalmente, se concluye que el uso del ozono (O₃) en agua, conduce a un desarrollo y esporulación más lenta del *fusarium sp.*, permitiendo un control de este hongo, aunque no se elimine por completo la infección.

Palabras clave: agua ozonizada, crecimiento, efecto, inhibidor, micelio

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCE AND NATURAL RESOURCES

THEME: “EVALUATION OF THE APPLICATION OF THREE CONCENTRATIONS AND TWO FREQUENCIES OF OZONE (O₃) FOR THE CONTROL OF THE FUNGUS *Fusarium* IN CULTURE MEDIA IN THE LABORATORY OF CAMPUS SALACHE, PERIOD 2023 - 2024”

Author:

Guzmán Gallardo Stefany Gabriela

ABSTRACT

The research was conducted at the Salache Academic Experimentation Center (CEASA) belonging to the Technical University of Cotopaxi. The aim was to assess the concentration and application frequency of ozone (O₃) for the control of *Fusarium oxysporum* sp. fungus under in vitro conditions. A factorial AXB arrangement was implemented, with 6 treatments and 4 repetitions, along with a control. Each treatment consisted of a Petri dish, totaling 24 experimental units. *Fusarium oxysporum* sp. was obtained through isolation from infected plant material, resulting in a purified fungus with the application of 3 concentrations and 2 frequencies of ozone (O₃). Two essays were conducted for ozonized water application: at the edge of the mycelium on the fifth day of growth and on the culture medium (PDA), with a control. Daily mycelial growth was recorded from the first application of ozonized water until the end of the assays, and data were analyzed using ANOVA in Excel and Infostat for verification. The research results indicated that T6 in both assays, with a concentration of 0.54 ppm and two application frequencies, exhibited the least radial growth among treatments, with average mycelial growth of 6.41 and 6.33 cm, respectively. Average growth rates were 0.23 and 0.22 cm/day, respectively. The results showed no statistically significant difference for the concentration and frequency variables. However, the comparison between Control and Treatments revealed a statistical difference in terms of average mycelial growth rate (cm/day). The effect achieved by the highest concentration (0.54 ppm) and frequency (2 applications) statistically differed from the control without application. Finally, it is concluded that ozone (O₃) in water leads to slower development and sporulation of *Fusarium* sp., allowing for control of this fungus, although complete infection elimination is not achieved.

Keywords: ozonated water, growth, effect, inhibitor, mycelium

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR.....	iii
AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	v
AVAL DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TITULACIÓN	vi
<i>AGRADECIMIENTO</i>	vii
<i>DEDICATORIA</i>	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
1 INFORMACION GENERAL.....	1
2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	3
4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	3
5 OBJETIVOS.....	4
1.1. General.....	4
1.2. Específicos	4
6 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACION CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS.....	5
7 FUNDAMENTACION CIENTIFICO TECNICA	6
7.1 Hongos en el suelo.....	6
7.2 Fusarium sp.	7
7.3 Fusarium oxysporum	7

7.3.1	Origen	8
7.3.2	Taxonomía	8
7.3.3	Signos y sintomatología	8
7.3.4	Condiciones en que se desarrolla la enfermedad.....	9
7.3.5	Ciclo de vida.....	10
7.3.6	Porque surge	10
7.3.7	Estructura.....	11
7.3.8	Medidas de manejo	12
7.4	El Ozono	13
7.4.1	Reacción de los microorganismos a la aplicación del ozono	13
7.4.2	Ozono en la agricultura.....	13
7.4.3	Acción del ozono en el suelo	14
7.5	Análisis de Varianza (ADEVA)	15
7.6	Tukey	15
7.7	In vitro.....	16
8	VALIDACION DE LAS PREGUNTAS CIENTIFICAS O HIPOTESIS	17
8.1	Hipótesis	17
8.1.1	Hipótesis Nula = H0	17
8.1.2	Hipótesis Alternativa = H1	17
8.2	Variables	17
8.2.1	Variables independientes	17
8.2.2	Variable dependiente	17
9	METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	17
9.1	Ubicación del ensayo	18
9.2	Tipo de investigación.....	18
9.2.1	Experimental.....	18

9.2.2	Exploratorio	19
9.3	Metodología	19
9.3.1	Método Científico	19
9.3.2	Método Experimental	19
9.4	Técnicas	19
9.4.1	Observación directa	19
9.4.2	Comparativa	20
9.4.3	Toma de datos.....	20
9.5	Materiales y Equipos	20
9.5.1	Material Vegetal	20
9.5.2	Materiales de laboratorio	20
9.5.3	Equipos	21
9.5.4	Reactivos y medio de cultivo	21
9.6	Diseño Experimental de la formulación	21
9.6.1	Factores en estudio	22
9.6.2	Tratamientos en estudio	23
9.7	Análisis Estadístico.....	23
9.8	Variable evaluada	24
9.9	Manejo Especifico del Experimento.....	24
9.9.1	Preparación de las concentraciones de Ozono.....	24
9.9.2	Aislamiento de Fusarium sp.	24
9.9.3	Purificación y siembra	25
9.9.4	Multiplicación.....	26
9.9.5	Aplicación de agua ozonizada	26
9.9.6	Mediciones	26
9.9.7	Análisis de datos.....	27

10	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
10.1	Resultados	27
10.1.1	Crecimiento del micelio (alrededor).....	27
10.1.2	Crecimiento del micelio (al medio PDA).....	29
10.2	Tasa de crecimiento promedio entre tratamientos	31
10.2.1	Tasa de crecimiento micelial promedio (alrededor).....	31
10.2.2	Tasa de crecimiento micelial promedio (al medio PDA)	33
10.3	Discusión	35
11	IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)..	36
11.1	Sociales	36
11.2	Ambientales	37
11.3	Económicos.....	37
12	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
12.1	Conclusiones.....	37
12.2	Recomendaciones	38
13	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Beneficiarios del Proyecto de Investigación.	3
Tabla 2.	Actividades planteadas por objetivos.	5
Tabla 3.	Clasificación taxonómica del hongo <i>Fusarium</i>	8
Tabla 4.	Factores de estudio que intervienen en la desinfección del hongo <i>fusarium sp.</i> utilizando diferentes concentraciones y frecuencias de ozono.	22
Tabla 5.	Tratamientos considerando los factores de estudio.	23
Tabla 6.	Esquema del ADEVA para el diseño propuesto para esta investigación.	23
Tabla 7.	Análisis de varianza en la inoculación de <i>fusarium sp.</i> , después de la aplicación de agua ozonizada.	27
Tabla 8.	Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del <i>fusarium oxysporum sp.</i> , alrededor.	28
Tabla 9.	Análisis de varianza en la inoculación de <i>fusarium oxysporum sp.</i> , después de la aplicación de agua ozonizada al medio.	29
Tabla 10.	Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del <i>fusarium oxysporum sp.</i> , aplicado al medio.	30
Tabla 11.	Análisis de varianza en la inoculación de <i>fusarium oxysporum sp.</i> , después de la aplicación de agua ozonizada, al alrededor.	31
Tabla 12.	Prueba Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del <i>fusarium oxysporum sp.</i> , alrededor.	32
Tabla 13.	Análisis de varianza en la inoculación de <i>fusarium oxysporum sp.</i> , después de la aplicación de agua ozonizada, al medio.	33
Tabla 14.	Prueba Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del <i>fusarium oxysporum sp.</i> , al medio.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Lugar de ejecución del ensayo.....	18
Figura 2.	Crecimiento micelial promedio del hongo <i>fusarium oxysporum sp.</i> después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, alrededor.....	28
Figura 3.	Crecimiento micelial promedio del hongo <i>fusarium sp.</i> después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, al medio.....	30
Figura 4.	Tasa de crecimiento micelial promedio del hongo <i>fusarium sp.</i> después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, alrededor.....	32
Figura 5.	Tasa de crecimiento micelial promedio del hongo <i>fusarium sp.</i> después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, al medio.....	34

1 INFORMACION GENERAL

Título del Proyecto:

“Evaluación de la aplicación de tres concentraciones de aplicación de Ozono (O₃) para el control del hongo *Fusarium* en medios de cultivo en el laboratorio del Campus Salache, Periodo 2023-2024”

Lugar de ejecución:

Salache, Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi, Zona 3.

Institución, unidad académica y carrera que auspicia:

Universidad Técnica de Cotopaxi, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, carrera de Ingeniería en Medio Ambiente.

Nombres de equipo de investigación:

Tutor: Mg. Marco Antonio Rivera Moreno.

Estudiante: Srta. Stefany Gabriela Guzmán Gallardo.

LECTOR 1: Mg. Jaime Lema

LECTOR 2: Mg. José Luis Agreda

LECTOR 3: Mg. Eduardo Cajas

Área de Conocimiento:

Ciencia Naturales. Medio Ambiente, Ciencias Ambientales.

Línea de investigación:

Análisis, conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

Sub-línea de Investigación de la Carrera:

Sostenibilidad Ambiental

Línea de Vinculación de la Carrera

Gestión de Recursos Naturales, Biodiversidad, Biotecnología y Genética, para el desarrollo humano y social.

2 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La desinfección del suelo es una etapa necesaria para asegurar la protección del medio ambiente y la salud pública. Actualmente existe un interés creciente en el tratamiento ambiental de suelos con el propósito de disminuir el impacto ambiental y evitar su contaminación y destrucción.

Por diversas razones, el ozono se considera una excelente alternativa para la desinfección de los suelos contaminados con hongos como el *fusarium*. Su capacidad de penetrar profundamente en el suelo le permite alcanzar y destruir estructuras de hongos como el *Fusarium*, incluidas esporas y micelios, que pueden estar presentes en el sustrato.

El desarrollo de este proyecto no solo beneficia a los productores de alimentos en campos o viveros donde el suelo puede estar contaminado por microorganismos patógenos como el *fusarium*, además beneficia a estudiantes, docentes y personas interesadas en el uso del ozono para desinfectar el suelo. Ya que frecuentemente, los agricultores carecen de los conocimientos para tratar las enfermedades de las plantas, buscando opciones como los fungicidas químicos de las casas comerciales agroquímicas. Siendo a menudo, productos de alta toxicidad pudiendo causar daños a largo plazo, como la erosión del suelo y la intoxicación de quienes los utilizan.

Es por ello, la importancia de este proyecto de investigación, ya que tiene como objetivo evaluar diferentes métodos alternativos para el control de enfermedades y plagas, como el Ozono (O₃), un método contemporáneo para abordar este tipo de investigaciones.

Además, con los resultados obtenidos podrán utilizarse como referencia para investigaciones más amplias, ya sea en entornos de laboratorio, invernaderos o en condiciones de campo.

3 BENEFICIARIOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Se han considerado a los agricultores del cantón Latacunga y los estudiantes de la carrera de Ingeniería Ambiental de la UTC como los beneficiarios directos del proyecto de investigación.

Tabla 1. Beneficiarios del Proyecto de Investigación.

BENEFICIARIOS DIRECTOS		BENEFICIARIOS INDIRECTOS
Agricultores de Latacunga	6.698 Hombres	Personal de los sectores agrícolas a nivel Nacional
	4.699 Mujeres	
Estudiantes de la Carrera de Ingeniería Ambiental	201 Hombres	
	321 Mujeres	
Total	11,919	

Nota. Información tomada de (INEC, 2001) y (UTC, 2020).

4 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Debido a la mala gestión de los recursos naturales, la protección del medio ambiente se ha convertido en una prioridad. Partiendo de ahí problemas de impacto ambiental que consideran a la agricultura como uno de los principales contribuyentes al uso indebido de productos químicos agrícolas, ya sean fertilizantes o pesticidas.

En Ecuador, las enfermedades bacterianas y fúngicas del suelo son la principal causa de pérdidas económicas en el sector agrícola. En un esfuerzo por abordar este problema, los agricultores han utilizado pesticidas y biosidas sin un conocimiento adecuado que causan desequilibrio en el suelo y efectos adversos diferentes a la biodiversidad natural de los cultivos (Sánchez, 2022).

El *fusarium* es un hongo patógeno del suelo que infecta muchos cultivos en todo el mundo. El uso de prácticas de intensificación agrícola y la falta de rotación de cultivos

han provocado un aumento de las infecciones por *fusarium sp.* en los últimos años. Además, la falta de variedades resistentes a enfermedades también contribuye a la mayor propagación de enfermedades de las plantas.

El desconocimiento entre los habitantes de la provincia de Cotopaxi hace que la productividad agrícola dependa de insumos agrícolas. Por lo tanto, es primordial promover la investigación y adopción de alternativas efectivas, seguras y respetuosas con el medio ambiente.

Además, se debe prestar atención al desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles y la implementación de medidas de control biológico para reducir la futura propagación de *fusarium*.

5 OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar la eficiencia de agua ozonizada para el control del hongo *fusarium sp.* en condiciones de laboratorio (in vitro) en el Centro Experimental CEASA.

5.2. Específicos

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del *fusarium sp.* en el laboratorio del Centro Experimental CEASA.
- Evaluar el efecto de diferentes frecuencias de aplicación de agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del *fusarium sp.*
- Establecer el mejor tratamiento dependiendo las concentraciones y frecuencias de aplicación de agua ozonizada para el control del hongo *fusarium oxysporum sp.*

6 ACTIVIDADES Y SISTEMA DE TAREAS EN RELACION CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS

Tabla 2. Actividades planteadas por objetivos.

Objetivos	Actividades	Metodología	Resultado
<ul style="list-style-type: none"> ● Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del <i>fusarium sp</i> en laboratorio, en el Centro Experimental CEASA 	<ul style="list-style-type: none"> ● Obtención de concentraciones de aguas de agua ozonificada. ● Aislamiento y purificación del hongo <i>Fusarium sp.</i> según (Castellanos et al., 2011). 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ozonificación del agua mediante un generador de ozono y un reactor. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Elección de las concentraciones para el experimento.
<ul style="list-style-type: none"> ● Evaluar el efecto de diferentes frecuencias de aplicación de agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del <i>fusarium sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ● Inoculación y multiplicación del hongo <i>Fusarium sp.</i> ● Aplicación del agua ozonificada al medio de cultivo y alrededor del micelio (Palacios, 2020). 	<ul style="list-style-type: none"> ● Aplicación de 1 ml de agua ozonizada al medio PDA y alrededor del micelio. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Obtención del inóculo madre de <i>fusarium oxysporum sp.</i> ● Control del patógeno <i>fusarium oxysporum sp.</i>
<ul style="list-style-type: none"> ● Establecer el mejor tratamiento 	<ul style="list-style-type: none"> ● Comparación de los 	<ul style="list-style-type: none"> ● Análisis estadístico 	<ul style="list-style-type: none"> ● Tablas ADEVA y

dependiendo las	resultados de	ADEVA	Tukey y
concentraciones y	laboratorio.	para	discusión
frecuencias de	• Análisis con	determinar	de los
aplicación de agua	trabajos	la	resultados.
ozonizada para el	relacionados	eficiencia	
control del hongo		del ozono.	
<i>fusarium oxysporum</i>			
<i>sp.</i>			

7 FUNDAMENTACION CIENTIFICO TECNICA

7.1 Hongos en el suelo

No son los organismos más importantes del suelo, pero contribuyen significativamente a la biomasa debido a su tamaño. Además, son el principal factor de descomposición en ambientes ácidos. A diferencia de las bacterias, los hongos pueden distinguirse efectivamente por su morfología. Tienen un micelio ramificado compuesto por hifas independientes, que pueden ser septadas o no, y presentan varias estructuras reproductivas capaces de producir esporas sexuales o asexuales (Sánchez, 2022).

Todos los hongos son organismos heterótrofos cuya actividad principal radica en la descomposición de moléculas complejas. Como fuentes de carbono utilizan almidón, pectina, disacáridos, celulosa, ácidos orgánicos y lignina, que son difíciles de degradar para las bacterias. Obtienen nitrógeno a partir del amonio como del nitrato, así como de proteínas, ácidos nucleicos, etc. Como son heterótrofos, dependen de la presencia de un sustrato de carbono oxidable. El incremento en la incorporación de estos sustratos conlleva a un aumento en la comunidad fúngica y a cambios en la dominancia relativa de géneros como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Beauveria* (Benintende & Sánchez, 2000).

7.2 *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* fue identificado por Link en 1809 y sigue siendo un género con gran número de especies, muchas de las cuales tienen la capacidad de incidir enfermedades en plantas, humanos y animales, producir metabolitos secundarios o micotoxinas (Leslie & Summerell, 2008) citado por (González, 2018).

Fusarium pertenece a la familia Nectriaceae. Es un género de hongos filamentosos que se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y asociados con las plantas. Aunque se ha descrito como una bacteria Gram negativa, la mayoría de las 28 especies son saprofitas y forman parte significativa del microbioma del suelo (Vida Sana, 2014).

La marchitez por *fusarium* es una enfermedad provocada por hongos que resulta en la marchitez vascular y afecta a numerosas especies de plantas, incluidos cultivos de importancia económica como papas, tomates, legumbres, melones y plátanos. Esta enfermedad es causada por el hongo del suelo *fusarium oxysporum*, que prospera a temperaturas del suelo superiores a 24°C y vivir en el suelo indefinidamente sin acceso a una planta huésped viva (Tsutomu, 2019).

Durante años, los tratamientos agroquímicos han jugado un papel importante en el manejo de enfermedades fúngicas. No obstante, esta práctica conlleva un riesgo considerable para la salud humana y al mismo tiempo contribuye a la contaminación ambiental (Abdel-Monaim et al., 2011) citado por (Albán, 2021).

7.3 *Fusarium oxysporum*

Las especies de *Fusarium oxysporum* están ampliamente presentes en las comunidades de hongos del suelo en todo tipo de suelos del mundo. La especie también se considera un contribuyente regular de las comunidades de hongos en la rizosfera de las plantas. Todas las cepas de *F. oxysporum* son saprofitas, capaces de prosperar y sobrevivir durante largos periodos en la materia orgánica del suelo y en la rizosfera de numerosas especies vegetales (Fravel et al., 2003)

7.3.1 Origen

Fusarium es un género de hongos con una amplia variedad de especies que se encuentran en todo el mundo. Desde la década de 1990, este hongo es el más común, ya que aparece en primeras etapas del cultivo (trasplante) y provoca pérdidas superiores al 50%, lo que equivale a 7,5 toneladas por ha-1 (Castro & Dávalos, 1990)

7.3.2 Taxonomía

A continuación, se presenta la taxonomía del hongo *Fusarium sp.* en la siguiente tabla:

Tabla 3. Clasificación taxonómica del hongo *Fusarium*.

Clasificación Taxonómica del <i>Fusarium sp.</i>	
Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Genero	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>F. oxysporum</i>

Nota: (Messiaen, 1989) citado por (E. D. Gómez, 2008)

7.3.3 Signos y sintomatología

Marchitamientos vasculares, manchas y añublos en las hojas, pudrición de raíces y tallos, pudrición de frutos, granos y semillas son enfermedades de las plantas causadas por especies del género *Fusarium* (Torres, 2000, p. 11) citado por (Cabrera et al., 2019).

Los síntomas primarios incluyen crecimiento lento y clorosis leve de algunas hojas, que progresa a un nivel moderado y así uniformemente a toda la hoja. Posteriormente, algunas ramas presentan marchitez y decoloración de los haces vasculares, que toman un tono rojizo. La enfermedad empeora con severa clorosis y se propaga a otras ramas. El tallo o ramas principales, se oscurecen más a medida que la lesión avanza hacia el centro. En etapas avanzadas, hay decoloración vascular y necrótica en las raíces, así como coloración rojiza de haces vasculares y necróticas en el cuello y tallo con progresión hacia la médula, que puede derivar en micelio. En determinados casos se puede observar la presencia de

frutos rugosos en diversos estados de madurez que permanecen adheridos a la planta. Finalmente se produce necrosis y muerte de la planta (Ortiz C. & Hoyos C., 2012).

Una característica distintiva de esta enfermedad es que los síntomas se manifiestan inicialmente en un solo lado de la planta, hasta que la enfermedad progresa y la planta muere. Además, la estructura del hongo no es visible en la superficie de la planta porque el hongo ataca desde abajo; se encuentra en el suelo, donde puede permanecer indefinidamente, y penetra a través de las raíces de la planta. Además, ciertas variantes particulares de *Fusarium oxysporum* pueden provocar la descomposición de semillas y plántulas, pudrición de raíces, tallos, partes inferiores de tallos, coronas, cormos, bulbos y tubérculos (p. ej., cebollas, lirios, gladiolos) (Villaverde, 2018).

7.3.4 Condiciones en que se desarrolla la enfermedad

El *Fusarium* puede desarrollarse en diversas condiciones, dependiendo de la especie y la enfermedad que cause. Sin embargo, hay algunos factores comunes que pueden contribuir a su desarrollo (Latorre, 2017):

- La presencia de semillas contaminadas puede introducir el hongo en el suelo y favorecer su propagación.
- La introducción de especies exóticas también puede facilitar la aparición del *Fusarium* en nuevas áreas.
- El hongo también puede ser transportado a largas distancias por el viento, lo que contribuye a su amplia distribución.
- Las condiciones climáticas también pueden influir en su desarrollo. Por ejemplo, el *Fusarium wilt* prefiere temperaturas cálidas y suelo húmedo, mientras que el *Fusarium root rot* se favorece por condiciones frescas y húmedas al comienzo de la temporada de crecimiento.
- La presencia de otros organismos, como nematodos, puede interactuar con el hongo y contribuir al desarrollo de enfermedades causadas por *Fusarium*.

El patógeno puede acceder al huésped a través de heridas autógenas típicas durante el desarrollo de las raíces, pero también puede verse favorecido por heridas radiculares causadas por prácticas de labranza o por la presencia de nematodos fitófago. Una vez ha ingresado en la planta, el patógeno se desplaza al tejido vascular mediante la colonización

intercelular de los vasos del xilema y penetrándolos a medida que maduran, o si la entrada se produce a través de una herida, ubicándose en ellos. La colonización de los vasos del xilema puede ocurrir mediante el crecimiento del micelio o mediante el transporte pasivo de los microconidios producidos en dichos vasos, lo que conduce a una colonización rápida e intermitente (LaMondia, 2015).

7.3.5 Ciclo de vida

En ausencia de sus anfitriones, el hongo puede sobrevivir en el suelo como micelio o como esporas. Si se encuentra cerca de una planta hospedera, la infección puede comenzar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua (Villa et al., 2015).

La mayoría de las especies de *Fusarium* solo producen esporas asexuales. Algunos también producen ascosporas. El ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* es similar al de la mayoría de las especies de *Fusarium*. *Fusarium* pasa el invierno durante muchos años en el suelo y en los residuos de cultivos de plantas infectadas como clamidosporas (células de micelio de paredes gruesas) o micelio. La supervivencia también es posible en semillas, estructuras de invernadero, herramientas y maquinaria. La infección primaria es transmitida por semillas o tiene lugar como infección de las raíces en la punta de la raíz o en pequeñas heridas, por ejemplo, donde las raíces laterales se ramifican desde la raíz principal (Bonelo et al., 2020).

Cuando una planta sana crece en un suelo infectado por el hongo, el contacto con las raíces hace que las esporas germinen, las esporas o hifas del hongo penetran directamente por la punta de la raíz o ingresan a las raíces a través de heridas o puntos de formación de las raíces laterales. El micelio se desplaza a través del córtex de las raíces de manera intercelular, y una vez que alcanza los vasos del xilema, pasan por las puntas, permanecen en los vasos y se mueven a lo largo de ellos, principalmente hacia arriba, hasta el tallo y la corona de la planta (Agrios, 2005) citado por (Albán, 2021).

7.3.6 Porque surge

Estos son solo algunos de los factores que pueden contribuir a la aparición del *Fusarium* (Latorre, 2017)

Condiciones ambientales favorables: El *Fusarium* se desarrolla mejor en condiciones de alta humedad y temperaturas cálidas. Estas condiciones tienen un entorno propicio para el crecimiento y la propagación del hongo.

Prácticas agrícolas inadecuadas: El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, el riego excesivo, la falta de rotación de cultivos y la ausencia de prácticas de manejo integrado de plagas pueden favorecer el desarrollo de enfermedades causadas por *Fusarium* en los cultivos.

Resistencia genética: Algunas variedades de plantas son más susceptibles a las infecciones por *Fusarium* que otras. La falta de resistencia genética en los cultivos puede aumentar la probabilidad de infección por *Fusarium*.

Contaminación de semillas: Las semillas infectadas con esporas de *Fusarium* pueden propagar la enfermedad a los cultivos. La falta de medidas de control de calidad en la producción de semillas puede contribuir a la propagación de *Fusarium*.

7.3.7 Estructura

Fusarium oxysporum no lleva a cabo reproducción sexual, así, el intercambio genético se restringe al ciclo parasexual y a la transformación genética. Esto implica la necesidad de heterocariosis, donde las hifas se fusionan y luego se produce la lisis celular (Gayosso et al., 2021).

El hongo *Fusarium* tiene una estructura filamentosa llamada micelio, que está formada por una red de finos filamentos conocidos como hifas. Estas producen estructuras más grandes cuando se entrelazan conocidas como micelios. Además, *Fusarium* puede producir esporas asexuales, que pueden aparecer en diversas estructuras como esporodios, conidios o clamidosporas, según la especie y las condiciones ambientales. Las esporas juegan un rol crucial en la dispersión y reproducción asexual del hongo. Dispersión del hongo y reproducción asexual (Martínez et al., 2019).

El micelio es inicialmente incoloro, pero a medida que madura se vuelve crema o amarillo pálido y, en determinadas condiciones, se vuelve rosa pálido o ligeramente violeta. Este patógeno genera tres tipos de esporas asexuales. Los microconidios, formados por una o dos células, son esporas que el hongo produce con mayor frecuencia y en mayor cantidad

en todas las condiciones. Se forman principalmente dentro de los vasos de las plantas huéspedes infectadas. Los macroconidios, esporas típicas de *Fusarium*, constan de 3 a 5 células y gradualmente se vuelven más delgadas y curvadas en ambos extremos. Aparecen en la superficie de las plantas que han sido afectadas por el patógeno y suelen formarse en grupos similares a los esporodoquios. El tercer tipo de espora son las clamidosporas, que están formadas por una o dos células, redondas y de paredes gruesas. Son esporas redondeadas que se forman en los extremos o en medio del micelio más antiguo, así como en los macroconidios del hongo (Agrios, 2005).

7.3.8 *Medidas de manejo*

Se han implementado diversas prácticas culturales, legales, biológicas, genéticas y químicas, siendo este último el más utilizado para el control de estos microorganismos patógenos. Sin embargo, el uso de fungicidas químicos para combatir enfermedades causadas por *Fusarium sp.* tiene impactos negativos en el medio ambiente y en la microbiología del suelo. Debido al uso excesivo de fungicidas, algunos hongos, por ejemplo, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, han desarrollado resistencia a productos como el Benzomyl 500, así como a formulaciones como Rhizolex-T y Homai WP (G. L. Rubio et al., 2008).

La propagación del patógeno se puede controlar de alguna manera mediante el uso de semillas limpias y la eliminación de los tejidos de plantas infectadas del área, aunque la estrategia de manejo más efectiva es sembrar variedades resistentes. Dependiendo de la forma *specialis* (forma específica del huésped) responsable de una infección dada, la enfermedad a veces se puede controlar con fungicidas del suelo, aunque algunas formas han desarrollado resistencia. Dada su longevidad, la rotación de cultivos es generalmente ineficaz (Wyckhuys et al., 2010).

Si la enfermedad persiste, lo mejor es quitar toda la planta y solarizar* el suelo antes de volver a plantar. Para solarizar el suelo, debe dejar una lona de plástico transparente sobre la superficie del suelo durante 4 a 6 semanas durante la parte más calurosa del año. La solarización del suelo reducirá o eliminará muchas plagas que habitan en el suelo, incluidos nematodos, hongos, insectos, malas hierbas y semillas de malas hierbas.

7.4 El Ozono

El ozono es uno de los oxidantes naturales más potentes. Es un gas natural formado por tres moléculas de oxígeno, su fórmula es (O₃). Este gas es incoloro, pero es azul cuando está en forma líquida. Tiene un olor característico, y es por ese olor que recibe su nombre, ya que la palabra ozono proviene del griego *ozein*, verbo que significa olor (Carnicer, 2008).

El ozono al ser un gas inestable, tiene una vida media de 30 a 45 minutos a 20°C y disminuye al 16 por ciento de su concentración inicial en 2 horas. Por tanto, debe prepararse inmediatamente antes de su uso. Con la variación del tiempo y la temperatura, vuelve al oxígeno (Mosqueira et al., 2021).

El ozono también ha demostrado ser eficaz como agente virucida, fungicida y bactericida en varios estudios. Se ha demostrado que en la agricultura proporciona beneficios adicionales tanto para las plantas como para los productores, incluido un crecimiento más fuerte de las plantas, tiempos de maduración más cortos, mayor rendimiento y sabor, y menor susceptibilidad a las enfermedades (Bucio et al. 2016) citado por (Avilés, 2022).

7.4.1 Reacción de los microorganismos a la aplicación del ozono

Con el tiempo, la ozonización se ha aplicado en el sector agrícola como mecanismo para combatir y matar hongos, esto se debe a que los productos químicos como el bromuro de metilo, las fosfinas, así como varios insecticidas y fungicidas utilizados en el manejo de plagas y enfermedades, resultan costosos y no son accesibles para los agricultores. Por lo tanto, se ha optado por el uso del ozono porque es una tecnología ecológica, que reemplaza químicos nocivos para la salud. Se han desarrollado estudios que demuestran que el uso del ozono en pequeñas dosis elimina y previene el crecimiento de hongos como *Fusarium spp.* y *Aspergillus spp.* (AGROSIBO, 2017) citado por (Román, 2023).

7.4.2 Ozono en la agricultura

La ventaja de usar ozono como método de esterilización es que no produce contaminantes en comparación con otros métodos de esterilización porque solo se produce oxígeno durante la descomposición.

El uso del ozono gaseoso se ha extendido, especialmente en la industria alimentaria, ya que permite la destrucción o inactivación de microorganismos. Además, el uso de gas ozono ha demostrado ser un método prometedor para reducir la cantidad de pesticidas en el suelo (Vidal, 2003).

Las microburbujas de ozono (OMB) se pueden utilizar como método de desinfección para patógenos de plantas en soluciones de cultivo hidropónico, y el tiempo de acción desinfectante del agua tratada con OMB aumenta a medida que aumenta la concentración inicial de ozono disuelto y la solubilidad de O_3 es mayor a menor temperatura del agua (Hidalgo & Oliva, 2019).

En la agricultura tradicional, los compuestos orgánicos presentes en el suelo se transforman en nutrientes minerales a través de procesos físico-químicos, y también, de manera más gradual, mediante procesos biológicos facilitados por la presencia de humus. El ozono agiliza el proceso de mineralización sin requerir la intervención de otros elementos, transformando la materia orgánica en un suelo que contiene una gran cantidad de nutrientes beneficiosos para el crecimiento de las plantas (Guisha, 2018).

7.4.3 Acción del ozono en el suelo

Para virus y bacterias, así como protozoos e insectos. El ozono actúa catalizando la oxidación de proteínas y liposacáridos, destruyendo su estructura. El ozono oxida las membranas bacterianas, debilita las paredes celulares y causa daño celular y la posterior muerte celular (Osorio, 2020).

Las moléculas de oxígeno se descomponen para formar fragmentos de oxígeno que se combinan con otras moléculas de oxígeno para formar ozono O_3 . En otro proceso de formación de ozono, el oxígeno se escapa a la atmósfera y el sol lo convierte en ozono (Concepción, 2016).

La desinfección del ozono se forma por oxidación. Después de producir ozono, la membrana celular de los microorganismos se destruye o dobla, y en ese momento, el ozono no funciona convirtiendo (ozono) en (oxígeno) O_2 . Este proceso se caracteriza por una velocidad muy alta. Se ha demostrado que solo 0,2 ppm de ozono durante 4 minutos pueden matar una gran cantidad de microorganismos en el suelo (Elbehri et al., 2015). Las plantas han logrado absorber cantidades reducidas de ozono y utilizarlas en su favor.

7.5 Análisis de Varianza (ADEVA)

El análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés) es un método estadístico que se utiliza para comparar las medias de tres o más grupos y determinar si existe una diferencia significativa entre ellos. La prueba ADEVA determina si las diferencias observadas entre grupos son mayores de lo esperado debido al azar. Determinar si un grupo es estadísticamente diferente de los demás grupos. Es comúnmente utilizado en experimentos para investigar el efecto de variables independientes (factores) sobre una variable dependiente.

La hipótesis nula (H_0) es la afirmación de que no existe relación entre las dos variables en estudio, mientras que la hipótesis alternativa (H_a) afirma que existe algún grado de relación o asociación entre dos variables. La decisión se puede tomar con confianza, lo cual está determinado de antemano por el nivel de significancia. Los diferentes test estadísticos comienzan evaluando la magnitud de las diferencias entre las medias de los grupos que se están comparando (M.-J. Rubio & Berlanga, 2012).

El riesgo de aceptar o rechazar una hipótesis se cuantifica mediante el valor “p”, que representa la probabilidad de aceptar la hipótesis alternativa como verdadera, incluso si la hipótesis verdadera es nula. El valor p indica si la relación es estadísticamente significativa o no. Este valor se elige de forma arbitraria y generalmente se fija en 0.05 o 0.01. Un nivel de confianza del 95% indicar un valor $p < 0,05$, mientras que un nivel de confianza del 99% implica un valor $p < 0,01$ (M.-J. Rubio & Berlanga, 2012).

7.6 Tukey

La prueba o método de Tukey fue desarrollado por John W. Tukey. Se trata de comparar los valores medios de todos los pares de tratamientos posibles. Por ejemplo, si hay 3 tratamientos, se realizan un total de 3 comparaciones; si hay 6 tratamientos, se llevan a cabo 15 comparaciones, y así sucesivamente. Es la prueba estadística más utilizada y preferida, ya que controla eficazmente los dos errores estadísticos más conocidos (α y β) (Montgomery, 2004) citado por (D. Gómez et al., 2019).

En la mayoría de los casos, esta prueba utiliza muestras balanceadas, lo que significa que todos los tratamientos tienen el mismo número de repeticiones u observaciones. Lo anterior sucede así porque dentro de los cálculos realizados en esta prueba se asume esta condición, razón por la cual algunos autores creen que la prueba de Tukey es aplicable solo en los casos en que existen grandes diferencias en el tamaño de la muestra de tratamientos (Fallas, 2012).

7.7 In vitro

El concepto de “in vitro” hace referencia al trabajo realizado fuera de un organismo vivo. Podría implicar el estudio de cultivos celulares o métodos para evaluar la respuesta de microorganismos a antibióticos.

La investigación in vitro permite a los científicos aislar y estudiar células, bacterias y virus sin las interferencias que conlleva observar un organismo completo.

El término in vitro se refiere a una variedad de procesos biológicos que ocurren fuera de un cuerpo vivo. Etimológicamente, esta palabra proveniente del latín significa “dentro del vaso” (es decir, se compone de “in” que significa dentro y “vítreo”, que se refiere a cristalería). Por lo general, el término “in vitro” se escribe en cursiva (Mosqueira et al., 2021).

Un ejemplo de aplicación sería el análisis in vitro. Este tipo de estudios metodológicos en laboratorio implican un proceso biológico realizado fuera del organismo vivo, con el fin de experimentar y observar, caracterizando su metodología (Mosqueira et al., 2021).

La mayor ventaja de estos estudios radica en la rapidez con la que se pueden obtener los resultados.

8 VALIDACION DE LAS PREGUNTAS CIENTIFICAS O HIPOTESIS

8.1 Hipótesis

8.1.1 *Hipótesis Nula = H0*

El uso del ozono (O₃) en diferentes concentraciones (0.40, 0.45 y 0.54 ppm) y frecuencias (1 y 2 aplicaciones) no incide en el control del hongo *fusarium sp.*

8.1.2 *Hipótesis Alternativa = H1*

El uso del ozono (O₃) en diferentes concentraciones (0.40, 0.45 y 0.54 ppm) y frecuencias (1 y 2 aplicaciones) incide en el control del hongo *fusarium sp.*

8.2 Variables

8.2.1 *Variables independientes*

- Concentración de agua ozonizada
- Frecuencia de aplicación

8.2.2 *Variable dependiente*

- Diámetro de crecimiento de *Fusarium sp* (alrededor).
- Diámetro de crecimiento de *Fusarium sp* (al medio)

9 METODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se a cabo dos ensayos independientes y sucesivos. El primero permitió determinar el mejor resultado de inhibición aplicando agua ozonizada alrededor del micelio una vez este haya alcanzado un crecimiento de 5-6 cm, mientras que el segundo ensayo permitió determinar el mejor resultado de inhibición aplicando agua ozonizada directamente al medio PDA. Ambos ensayos se realizaron en condiciones idénticas en cuanto a la

ubicación, el material vegetal y el manejo del ensayo, y se evaluaron las mismas variables: crecimiento micelial promedio y la tasa de crecimiento promedio del micelio (cm/día).

9.1 Ubicación del ensayo

El proyecto de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi, UTC, ubicado sector de Salache, Cantón Latacunga, en la Provincia de Cotopaxi a 2731 msnm; 78.6155 de longitud; y 0.9352 latitud.

Figura 1. Lugar de ejecución del ensayo



Fuente: Google Earth

9.2 Tipo de investigación

9.2.1 *Experimental*

La investigación fue de carácter experimental con un enfoque cuantitativo. Debido a que los datos se obtuvieron a través de un ensayo. Se utilizaron métodos de laboratorio conocidos para evaluar variables en un entorno controlado; y se fundamentara en la toma

y tabulación de datos, para realizar análisis estadísticos y así comparar los resultados con la investigación bibliográfica.

9.2.2 Exploratorio

Este trabajo también se considera exploratorio, por lo que sus hallazgos podrían servir como guía para futuras investigaciones de mayor profundidad, tanto en laboratorio como en campo.

9.3 Metodología

9.3.1 Método Científico

Basado en seguir ciertos pasos para obtener conocimiento (científico) confiable usando herramientas confiables que, de acuerdo con la información establecida, puedan ser repetidos por cualquier persona y en cualquier lugar.

9.3.2 Método Experimental

Este estudio es de carácter experimental, en el que se evaluaron diferentes concentraciones de exposición al agua ozonizada en diferentes momentos para controlar el hongo *fusarium sp.*

Se aplicará el método experimental para comprobar los efectos de intervención entre los factores de estudio. Una vez obtenidos los resultados, se procesarán aplicando métodos estadísticos para estructurar el ADEVA (Análisis de varianza); y el diseño factorial AxB.

9.4 Técnicas

9.4.1 Observación directa

Esta técnica permitirá la observación directa del microorganismo luego de la aplicación de ozono.

9.4.2 Comparativa

Usando este método, se comparó y evaluó la efectividad de cada tratamiento.

9.4.3 Toma de datos

Sera importante tomar los datos del ensayo para su posterior análisis.

9.5 Materiales y Equipos

9.5.1 Material Vegetal

- Muestras de tallos de Flor de verano

9.5.2 Materiales de laboratorio

- Cajas Petri de 8 cm de diámetro
- Fundas plásticas
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Papel Parafilm
- Papel Film
- Mandil
- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla quirúrgica
- Alcohol 70°
- Alcohol 96°
- Vasos de precipitación (100 ml)
- Envases (250, 500 ml)
- Estuche de disección
- Asa de siembra
- Pinza
- Mechero
- Gotero

- Aro de 1 cm
- Calibrador Vernier
- Esferográfico

9.5.3 *Equipos*

- Generador de ozono de 5 g/h (Modelo QJ- 8003K)
- Medidor de Ozono marca PALINTES modelo PTS043
- Autoclave
- Cámara Húmeda
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Microscopio
- Balanza digital
- Cámara Fotográfica
- Computadora

9.5.4 *Reactivos y medio de cultivo*

- Agua tratada
- Agua destilada
- Medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Antibiótico

9.6 **Diseño Experimental de la formulación**

Se aplicó un diseño factorial AxB, donde Factor A (Concentración de ozono), Factor B (Frecuencia), estos factores con sus niveles se encuentran visibles en la Tabla 3, con un arreglo grupal de 6 tratamientos y 4 repeticiones. Las 24 unidades experimentales fueron cajas Petri con discos de *Fusarium sp.* inoculados en medio de cultivo PDA. Por último, se llevó a cabo un ANDEVA para constatar diferencias significativas entre los tratamientos con prueba de medias de Tukey al 5% por medio del programa de análisis estadístico Infostat versión estudiantil 2020:

9.6.1 Factores en estudio

Las concentraciones de agua ozonizada se obtuvieron mediante un equipo ozonizador, donde obtuvieron las concentraciones estándar del equipo.

FACTOR A: 3 concentraciones y 1 testigo

- C1: 0,40 ppm
- C2: 0,45 ppm
- C3: 0,54 ppm
- Testigo

Se establecieron dos frecuencias de aplicación como segunda variable en estudio.

FACTOR B: Frecuencia

- F1: 1 aplicación
- F2: 2 aplicaciones

Tabla 4. Factores de estudio que intervienen en la desinfección del hongo fusarium sp. utilizando diferentes concentraciones y frecuencias de ozono.

Factores	Simbología	Descripción del proceso
A: Concentraciones de Ozono	a ₁	0,40 ppm
	a ₂	0,45 ppm
	a ₃	0,54 ppm
B: Frecuencias	f ₁	1 vez
	f ₂	2 veces

9.6.2 *Tratamientos en estudio*

De la interacción de los dos factores en estudio se tienen 6 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, teniendo un total de 24 unidades experimentales y un Testigo.

Tabla 5. Tratamientos considerando los factores de estudio.

Tratamientos	Simbología	Descripción
1	$a_1 + f_1$	0,40 ppm + 1 vez
2	$a_1 + f_2$	0,40 ppm + 2 veces
3	$a_2 + f_1$	0,45 ppm + 1 vez
4	$a_2 + f_2$	0,45 ppm + 2 veces
5	$a_3 + f_1$	0,54 ppm + 1 vez
6	$a_3 + f_2$	0,54 ppm + 2 veces

9.7 **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos a obtenerse se efectuó mediante el análisis de varianza (ADEVA), que es una técnica empleada para analizar la variación total de los datos, descomponiéndolas en porciones significativas e independientes, atribuibles a cada una de las fuentes de variabilidad presentes y la variación causal (aleatoria).

Tabla 6. Esquema del ADEVA para el diseño propuesto para esta investigación.

Fuente de variación	Grados de libertad
----------------------------	---------------------------

Tratamientos	(t-1)	5
Repeticiones	(r-1)	3
Factor a	(a-1)	2
Factor b	(b-1)	1
Interacción axb	(a-1)(b-1)	2
Error Experimental	(t-1)(r-1)	18
Total		23

9.8 Variable evaluada

El diámetro del crecimiento in vitro del micelio del *Fusarium sp.*, expresado en centímetros, fue la variable evaluada.

9.9 Manejo Especifico del Experimento

9.9.1 Preparación de las concentraciones de Ozono

Las concentraciones de agua ozono utilizadas en los ensayos fueron 0.40, 0.45 y 0.54 ppm (mg/L), basadas en pruebas preliminares realizadas en el Laboratorio de semillas del Proyecto “Granos Andinos”. Para obtener la inhibición del hongo *Fusarium sp.*, se empleó una maquina generadora de ozono de 5 g/h, modelo QJ-8003K y se justificó las concentraciones utilizadas por medio de un medidor de concentración de ozono en mg/L de la marca Palintest.

9.9.2 Aislamiento de *Fusarium sp.*

De acuerdo con (Castellanos et al., 2011), el proceso de aislamiento del hongo comienza:

- Se toman muestras del tallo de las muestras vegetales con sintomatología de marchitamiento por *Fusarium sp.*

- Envolver las muestras de tejido infectado (raíces o tallos) en toalla de papel para absorber la humedad.
- Colocar las muestras de tejido infectado, envueltas en papel absorbente, en sobres o bolsas de papel. Evitando el uso de bolsas de plástico, ya que no son permeables y pueden generar la acumulación de humedad, favoreciendo el desarrollo de microorganismos saprofitos y dificultando el aislamiento del patógeno.
- Etiquetar claramente cada muestra con la información detallada. La etiqueta debe estar bien adherida a cada muestra.
- Preparar el medio de cultivo PDA (papa, dextrosa y agar) para aislar el patógeno y otros microorganismos. Materiales: PDA deshidratado 39 g/L; agua destilada 1 litro; Frasco Erlenmeyer 1000 mL; cajas Petri. Pesar los ingredientes, disolver el PDA en el agua destilada, envasar en los frascos y esterilizar en la autoclave a 121°C durante 40 minutos. Luego, se deja enfriar el medio esterilizado y se vierte en las cajas Petri.
- Todos los procedimientos deben realizarse en una cámara de flujo laminar. Además, se deben mantener todas las normas de asepsia y esterilidad requeridas en un laboratorio microbiológico, aplicando siempre las buenas prácticas microbiológicas (BPM).

Para el aislamiento, se hicieron cortes de 1 cm a los tallos del material vegetal y se los desinfectó en una solución de 2% de hipoclorito con 98% de agua destilada, durante 3 min. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada para eliminar contaminantes potenciales que podrían obstaculizar el aislamiento de los hongos. En la cámara de flujo laminar, se sembró cuatro trozos del material vegetal espaciadas en forma de cuadrado con unas pinzas en cada caja con medio PDA y se incubó durante 10 días a 28°C.

9.9.3 Purificación y siembra

En la cámara de flujo laminar con el asa de siembra esterilizado y desinfectado con alcohol y flameado, y por método de estría se tomó pequeños pedazos del hongo presente en las cajas para posteriormente sembrarlas en nuevas cajas Petri con medio de cultivo PDA. Esto para obtener nuevas muestras más puras del hongo *Fusarium sp.*, sin presencia de restos vegetales para su posterior multiplicación en el experimento.

9.9.4 Multiplicación

Con un sacabocado, se sembró trozos cilíndricos de 1 cm de diámetro de muestra contaminada en el centro de cajas Petri con nuevo medio de cultivo, se rotularon y sellaron. Se incubaron a 28° C. Para que los discos de *fusarium sp.*, se adapten al nuevo medio de cultivo y crezcan a un diámetro adecuados para las aplicaciones de agua ozonificada.

9.9.5 Aplicación de agua ozonizada

Siguiendo el método de aplicación de (Palacios, 2020) el ozono se aplicó de dos formas alrededor del micelio y al medio PDA :

- Alrededor del micelio

Para la aplicación del agua ozonizada se usó un gotero y se colocó 1 ml de gotas alrededor de los bordes del micelio del hongo *fusarium sp.* con crecimiento de entre 5 cm de diámetro en cada una de las cajas., la segunda aplicación se lo hizo al octavo día.

- Al medio PDA

Se usó un gotero para aplicar agua ozonizada y se vertió 1 ml en la caja con PDA solidificada. El contenido se esparció por todo el medio de cultivo con la base de un tubo de ensayo previamente esterilizado hasta que quedó impregnado en el mismo. Posteriormente, un disco de *fusarium sp.* se colocó en cada una de las cajas que ya han sido ozonificadas, para la segunda aplicación se lo hizo al quinto día.

9.9.6 Mediciones

Para el registro de las mediciones se utilizó un calibrador vertier, tomando datos de manera diaria posterior a la aplicación del agua ozonizada, para obtener el promedio de crecimiento micelial y la tasa de crecimiento del hongo *fusarium oxyaporum sp.* Las medidas se sumaron y promediaron por tratamiento hasta que el crecimiento micelial del testigo ocupará por completo la caja, dando por terminado el experimento.

9.9.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos del crecimiento micelial del hongo *fusarium sp.* fueron tabulados en una hoja electrónica de Excel. Para llevar a cabo el Análisis de Varianza (ADEVA) se utilizó el programa Infostat versión estudiantil 2020, los resultados fueron expresados en tablas, figuras y texto. Se empleó pruebas Tukey al 5% para la comparación de rangos de medias. Para el presente proyecto se tomó en consideración los grados de significancia, valor p o α de: $< 0,10$ (*), $<0,05$ (**), $0,01$ (***). en donde la confianza será del 90%, 95% y 99% respectivamente.

10 ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Resultados

Los resultados obtenidos en el laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, de la Universidad Técnica de Cotopaxi, se presentan a continuación:

10.1.1 Crecimiento del micelio (alrededor)

Según, los datos de la Tabla 7, en el análisis de varianza se observa que la aplicación de agua ozonizada tuvo un efecto positivo sobre el hongo *fusarium sp.* hubo diferencia estadística para los Tratamientos vs. Testigo por lo que es necesario realizar la prueba Tukey al 5%, para el resto de variables no hubo diferencia estadística.

Tabla 7. Análisis de varianza en la inoculación de *fusarium sp.*, después de la aplicación de agua ozonizada.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	F crítico
Concentraciones	0.19	2	0.10	0.77	0.48	3.47
Frecuencias	0.35	1	0.35	2.69	0.12	4.32
Concentraciones*Frecuencia	0.11	2	0.06	0.46	0.64	3.47
Factores vs Testigo	0.67	1	0.67	4.95	0.04	4.32 *
Error	2.82	21	0.1			
Total	4.14	27				
CV	5.38					

Se obtuvo un coeficiente de variación de 5.38%, demostrando que es confiable ya que es menor al 10% para los casos de investigación en condiciones controladas, es decir, en laboratorio.

Tabla 8. Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del *fusarium oxysporum sp.*, alrededor.

Tratamientos	Medias	Rango
t6	6.41	A
t4	6.73	A
t2	6.76	A
t5	6.84	A
t1	6.89	A
t3	6.89	A
Testigo	7.19	A

Al aplicar la prueba de Tukey al 5%, se observa un rango de significación estadística en la Tabla 8, que muestra las medias de cada tratamiento y el testigo para la reducción del crecimiento micelial del *fusarium sp.* tras el uso de agua ozonizada, siendo el tratamiento T6 el que mejor resultado obtuvo de inhibición.

Figura 2. Crecimiento micelial promedio del hongo *fusarium oxysporum sp.* después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, alrededor.



El análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5% ayudaron a establecer diferencias entre los tratamientos. Se evaluó el efecto inhibitor del agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del *fusarium sp.* usando diferentes concentraciones y frecuencias al quinto día de crecimiento. Como resultado (Figura 2), se determinó que, entre los seis tratamientos, el que tuvo mayor desempeño inhibitor fue el T6 con un crecimiento de 6,41 cm al finalizar el ensayo. Seguido de los tratamientos T4 y T2, con 6.73 y 6.76 cm, respectivamente. Y los tratamientos T5, T1 y T3 fueron los más cercanos al Testigo con 6.84, 6.89, 6.89 y 7.19 cm, respectivamente. La aplicación de ozono, retrasa el desarrollo y propagación del hongo, permitiendo un control de estos microorganismos, aunque no se elimine por completo la infección (Avilés, 2022)

10.1.2 Crecimiento del micelio (al medio PDA)

A partir de la Tabla 9, en el análisis de varianza podemos observar que la aplicación de agua ozonizada tuvo un efecto positivo sobre el hongo *fusarium sp.*, hubo significación estadística para los Tratamientos vs. Testigo por lo que es necesario realizar la prueba Tukey al 5% y para el resto de variables no hubo significación estadística.

Tabla 9. Análisis de varianza en la inoculación de *fusarium oxysporum sp.*, después de la aplicación de agua ozonizada al medio.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	F crítico
Concentraciones	0.65	2	0.32	1.78	0.19	3.47
Frecuencias	0.03	1	0.03	0.17	0.69	4.32
Concentraciones*Frecuencia	2.50E-03	2	1.20E-03	6.67E-03	0.99	3.47
Factores vs. Testigo	1.25	1	1.25	7.09	0.01	4.32 *
Error	3.72	21	0.18			
Total	5.65	27				
CV	6.30					

Se visualiza un coeficiente de variación de 6.30%, demostrando que es confiable ya que es menor al 10% para los casos de investigación en condiciones controladas, es decir, en laboratorio.

Tabla 10. Prueba de Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del *fusarium oxysporum sp.*, aplicado al medio.

Tratamientos	Medias	Rango
t6	6.33	A
t5	6.4	A
t4	6.6	A
t3	6.7	A
t2	6.73	A
t1	6.78	A
Testigo	7.19	A

Al realizar la prueba de Tukey al 5%, se observa un rango de significación estadística en la Tabla 10, que muestra las medias de cada tratamiento y el testigo para la reducción del crecimiento micelial tras el uso de agua ozonizada, mostrando el tratamiento T6 como el que mejor resultado obtuvo.

Figura 3. Crecimiento micelial promedio del hongo *fusarium sp.* después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, al medio.



El análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5% ayudaron a establecer diferencias entre los tratamientos. Se evaluó el efecto inhibitor del agua ozonizada sobre el crecimiento micelial del *fusarium sp.* usando diferentes concentraciones. Como resultado (Figura 3), se determinó que, entre los seis tratamientos, el que tuvo mayor desempeño inhibitor fue

el T6 con un crecimiento de 6,33 cm. Seguido, de los tratamientos T5 y T4 con un crecimiento de 6.40 y 6.60 cm, respectivamente. Los tratamientos T3, T2, T1 obtuvieron resultados cercanos al Testigo con un crecimiento de 6.70, 6.73, 6.78 y 7.19, respectivamente. (Samaniego, 2022), confirmo que ha mayores concentraciones de ozono, se observa una mayor disminución microbiana, como se evidencia con una concentración de 0,54 ppm. De la misma manera, (Chonata, 2018) obtuvo una máxima inhibición de microorganismos con una concentración de 0,5 ppm de ozono (O₃).

10.2 Tasa de crecimiento promedio entre tratamientos

Se estableció una tasa de crecimiento de acuerdo a los días indicados para registrar el diámetro de crecimiento y poder determinar sobre cuál de los tratamientos se obtendría una concentración y frecuencia adecuada que muestre un efecto inhibitor del agua ozonizada sobre el *Fusarium oxysporum sp.*

10.2.1 Tasa de crecimiento micelial promedio (alrededor)

El análisis de varianza de la tabla 11, muestra que la aplicación de agua ozonizada tuvo un efecto significativo sobre la Tasa de crecimiento promedio del hongo *fusarium sp.* hubo una significación estadística para los Tratamientos vs. Testigo, para el resto de variables no hubo significación estadística. Se obtuvo un coeficiente de variación de 26.17%, es necesario realizar la prueba de Tukey al 5%.

Tabla 11. Análisis de varianza en la inoculación de *fusarium oxysporum sp.*, después de la aplicación de agua ozonizada, al alrededor.

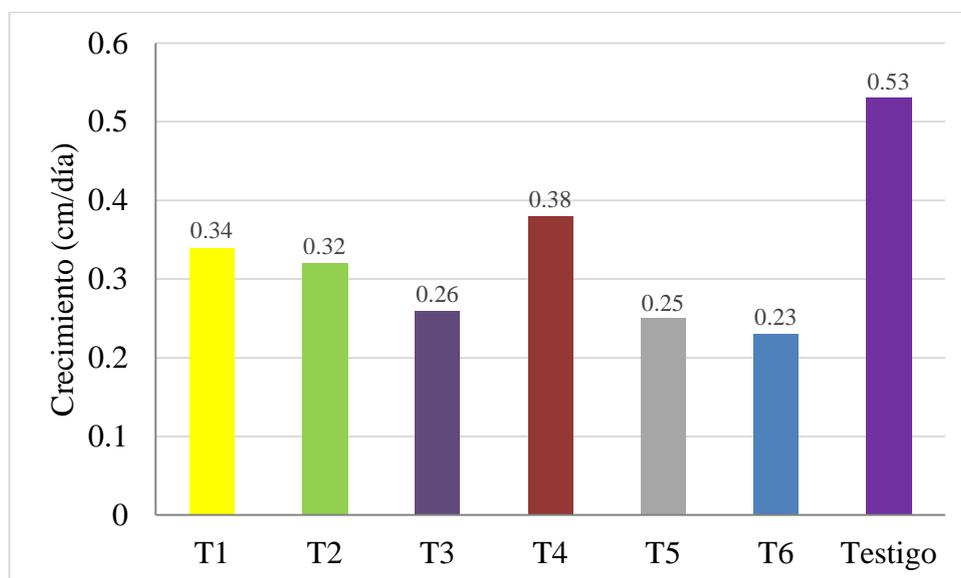
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Concentraciones	0.04	2	0.02		2 0.16
Frecuencias	4.50E-03	1	4.50E-03	4.50E-01	0.51
Concentraciones*Frecuencia	0.03	2	0.01		1 0.38
Factores vs. Testigo	0.19	1	0.19	25.66	0.0001 *
Error	0.16	21	0.01		
Total	0.42	27			
CV			26.17		

Tabla 12. Prueba Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del *fusarium oxysporum sp.*, alrededor.

Tratamientos	Medias	Rangos
t6	0.23	A
t5	0.25	A
t3	0.26	A
t2	0.32	A
t1	0.34	A B
t4	0.38	A B
Testigo	0.53	B

Al aplicar la prueba de Tukey al 5%, se observan dos rangos de significación estadística en la Tabla 12, que muestra las medias de cada tratamiento en cuanto a la tasa de crecimiento micelial promedio tras el uso de agua ozonizada. En el rango A los tratamientos T6, T5, T3 y T2: compartiendo rango los tratamientos T1 y T4 y en el rango B el testigo.

Figura 4. Tasa de crecimiento micelial promedio del hongo *fusarium sp.* después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, alrededor.



El análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5% ayudaron a establecer diferencias entre los tratamientos. Se evaluó el efecto inhibitor del agua ozonizada sobre la Tasa de crecimiento micelial del *fusarium sp.* utilizando diferentes concentraciones y frecuencias.

Como resultado (Figura 4), se determinó que, entre los seis tratamientos, el que tuvo una menor tasa fue el T6 con 0.23 cm/día, seguido de los tratamientos T3 = 0,26 cm/día, T5 = 0,25 cm/día. Los tratamientos T1 = 0,34 cm/día, T2 = 0,32 cm/día y T4 = 0,38 cm/día fueron los valores más altos de crecimiento y los más cercanos al Testigo con 0,53 cm/día. Se observa que el T6 con una concentración de 0.54 ppm y con dos frecuencias de aplicación es el que presenta la tasa de crecimiento micelial promedio más baja. (Guisha, 2018), determino que al aplicar ozono a dos frecuencias es efectiva para el control de fitopatógenos como *fusarium sp*, *Pythium sp* y *Phytophthora sp*.

10.2.2 Tasa de crecimiento micelial promedio (al medio PDA)

El análisis de varianza de la Tabla 13, muestra que la aplicación de agua ozonizada tuvo un efecto significativo sobre la Tasa de crecimiento promedio del hongo *fusarium sp.*, hubo una significación estadística para los Tratamientos vs. Testigo, y para el resto de variables no hubo significación estadística. Se obtuvo un coeficiente de variación de 19.74% lo que indica que la dispersión de los datos es mayor, es decir, la tasa de crecimiento micelial no es homogéneo, es necesario realizar la prueba de Tukey al 5%.

Tabla 13. Análisis de varianza en la inoculación de *fusarium oxysporum sp.*, después de la aplicación de agua ozonizada, al medio.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Concentraciones	0.03	2	0.01		1 0.38
Frecuencias	2.00E-04	1	2.00E-04	2.00E-02	0.89
Concentraciones*Frecuencia	0.01	2	0.01		1 0.38
Factores vs. Testigo	0.21	1	0.21		21 <0.0001 **
Error	0.08	21	0.01		
Total	0.34	27			
CV			19.74		

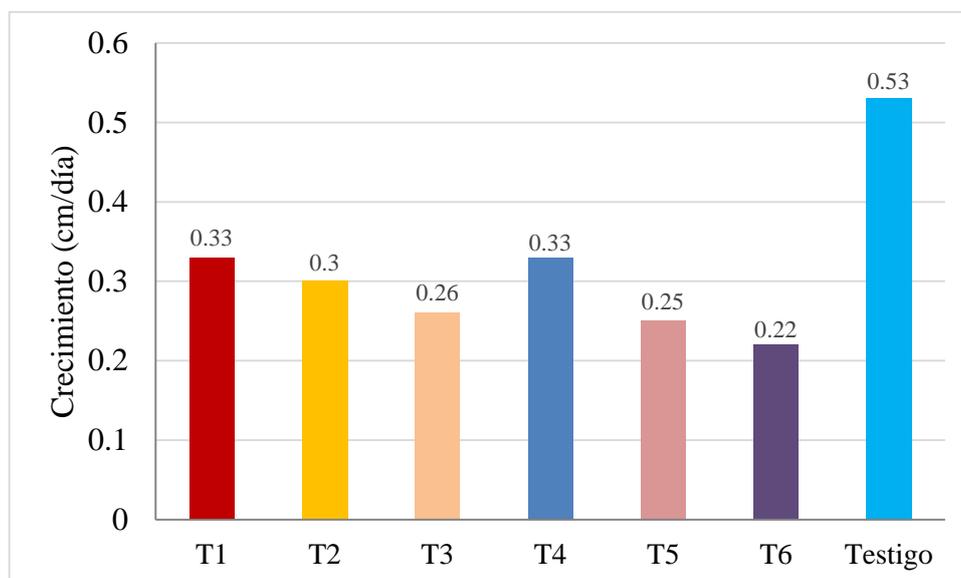
Tabla 14. Prueba Tukey al 5% para Tratamientos vs. Testigo en la inhibición del *fusarium oxysporum sp.*, al medio.

Tratamientos	Medias	Rangos
t6	0.22	A
t5	0.25	A

t3	0.26	A
t2	0.3	A
t1	0.33	A
t4	0.33	A
Testigo	0.53	B

Al realizar la prueba de Tukey al 5%, se observan dos rangos de significación estadística en la Tabla 14, que muestra las medias de cada tratamiento en cuanto a la tasa de crecimiento micelial promedio tras el uso de agua ozonizada. En el rango A, están los seis tratamientos siendo el T6 el que mejor efecto inhibitor obtuvo y en el rango B el testigo que tuvo un mayor crecimiento micelial al final del ensayo.

Figura 5. Tasa de crecimiento micelial promedio del hongo *fusarium sp.* después de la aplicación de agua ozonizada y el testigo, al medio.



El análisis de varianza y la prueba de Tukey al 5% ayudaron a establecer diferencias entre los tratamientos. Se evaluó el efecto inhibitor del agua ozonizada sobre la Tasa de crecimiento micelial promedio del *fusarium sp.* utilizando diferentes concentraciones y frecuencias de aplicación. Como resultado (Figura 5), se determinó que, entre los seis tratamientos, el que tuvo menor tasa de crecimiento fue el T6 con 0.22 cm/día, seguido de los tratamientos T3 = 0,26 cm/día, T5 = 0,25 cm/día. Los tratamientos T1 = 0,33 cm/día T2 = 0,30 y T4 = 0,33 cm/día fueron los valores más altos de crecimiento y los

valores más cercanos al Testigo con 0.53 cm/día. Se determina que el T6 con una concentración de 0.54 ppm y con dos frecuencias de aplicación es el que presenta la tasa de crecimiento micelial promedio más baja. Se ha demostrado que con una cantidad mínima de 0,2 ppm de ozono (O₃) durante 4 minutos, se puede eliminar una gran cantidad de microorganismos en el suelo (Elbehri et al., 2015).

10.3 Discusión

Los resultados muestran que no existió una diferencia estadística significativa para las variables concentración y frecuencia. Sin embargo, el análisis del Testigo vs. Tratamientos muestra una diferencia estadística en cuanto a la tasa crecimiento promedio del micelio. El efecto logrado por la mayor concentración (0.54 ppm) y frecuencia (2 aplicaciones) se diferenció estadísticamente del testigo sin aplicación. La posibilidad de seguir incrementando la concentración y frecuencias de aplicación es viable ya que se evidencio un retraso en el crecimiento y esporulación del *fusarium sp*. En lo que respecta a los tratamientos, de los T6 de ambos ensayos, los resultados obtenidos fueron similares para la tasa de crecimiento con 0.22 y 0.23 cm/día, respectivamente.

(Guisha, 2018), en su estudio menciona que con una concentración de 0.5 ppm de agua ozonizada a dos frecuencias al día, se destaca como la alternativa en contrarrestar la germinación de inoculación en el control del Damping off (*Phytium, Fusarium oxysporum, Phytophthora*) en el cultivo de amaranto y no generando efectos adversos en el desarrollo de la planta. Aunque, estadísticamente al igual que este estudio los resultados no tuvieron diferencias estadísticas significativas. La relación existente entre el porcentaje de incidencia presente en los tratamientos inoculados demuestra la eficiencia del ozono al controlar al patógeno, señalando así que existe mayor control y un correcto desarrollo del cultivo sin presentar alteraciones.

Al igual que, (Samaniego, 2022) quien en su estudio utilizo concentraciones de 0.3 y 0.5 ppm de agua ozonizada considera una concentración de 0,5ppm como óptima debido que existe mayor control al momento sobre la incidencia de enfermedades fúngicas. Concluye que las concentraciones de 0.5 ppm debido a sus variables de interés, al utilizar esta concentración se aproximan a los valores requeridos en el proceso de comercialización.

Esto beneficiaría económicamente a los agricultores, dándoles oportunidad a nuevos mercados.

La aplicación del agua ozonizada en el medio PDA obtuvo un mejor resultado en comparación a su aplicación alrededor del micelio, esto teniendo en cuenta el crecimiento promedio al finalizar el ensayo, ya que tuvo un menor diámetro de crecimiento y un retraso en el tiempo de esporulación del *fusarium sp.*, teniendo un mejor efecto, con una concentración de 0,54 ppm, con dos frecuencias de aplicación. Finalmente se deduce, que la aplicación del agua ozonizada en campo será más beneficiosa, antes de que el hongo empiece su desarrollo. El uso de tratamientos con ozono ha demostrado ser más rentable y menos perjudiciales para el medio ambiente en comparación con el uso de productos químicos con propósitos similares. Los hongos son destruidos por los efectos oxidantes del ozono, lo cual causa un daño irreversible a la célula. Se requieren concentraciones bajas de ozono para lograr superficies libres de hongos, pero se requieren concentraciones más altas para matar las colonias establecidas (Zambrano, 2021). A pesar de ser considerado como un contaminante ambiental, en campo las plantas han demostrado ser capaces de absorber pequeñas cantidades de ozono y utilizarlos a su beneficio para su propio desarrollo (González et al., 2022).

11 IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

11.1 Sociales

La información proporcionada en este documento es beneficiosa para cualquier persona interesada, ya que los resultados obtenidos son favorables para aplicaciones en la agricultura. Además, esto reduciría la exposición de los agricultores y las comunidades circundantes a los productos sintéticos utilizados en los fungicidas; y se podría mejorar la seguridad de los alimentos para los consumidores.

11.2 Ambientales

El uso del Ozono (O₃) como alternativa a los fungicidas para el control del *fusarium sp.* produciría un impacto positivo al reducir la contaminación generada por estos compuestos. Promoviendo prácticas más sostenibles, como una agricultura orgánica o regenerativa, que tiene un menor impacto ambiental global.

11.3 Económicos

Aunque la tecnología de ozonización implica una inversión inicial de equipos y capacitación, a largo plazo resulta en una reducción de costos al eliminar o reducir la compra de fungicidas y otros productos agroquímicos. Además, el producir alimentos de manera sostenibles y respetuosas con el medio ambiente podría crear oportunidades económicas para los agricultores al abrir nuevos mercados y aumentar las oportunidades de exportación.

12 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

12.1 Conclusiones

- Al analizar la eficiencia del ozono la tercera concentración de ozono de 0,54 ppm a dos frecuencias de aplicación con un promedio de crecimiento micelial final de 6.41 y 6.33 cm, en comparación al testigo que tuvo un crecimiento de 7.35 cm, indicando que el ozono controla, aunque no de manera significativa.
- El uso de ozono a dos frecuencias (una al principio y otra a la mitad de la vida del hongo) es más efectivo para controlar el hongo *fusarium sp.*, como se evidencia en la tasa de crecimiento promedio de los T6 (0.23 y 0.22 cm/día) durante un tiempo de incubación de 10 días.
- Los tratamientos que mejor resultado presentaron fueron los T6, con menor crecimiento promedio y menor tasa de crecimiento promedio, mostrando un control del hongo *fusarium sp.*, es más efectiva al aplicar el ozono cuando no está tan avanzada la enfermedad, ya que esto genera un desarrollo y esporulación más lenta del hongo que el testigo sin tratamiento.

12.2 Recomendaciones

- Se recomienda que se continúe con la investigación para el uso del ozono como agente desinfectante en sus diferentes combinaciones (agua, gas y aceite).
- Realizar ensayos con concentraciones mayores a 0.8 ppm para mejorar la eficiencia de estas concentraciones en el control de microorganismos que afectan a los cultivos.
- Se recomienda la aplicación inmediata del agua ozonizada ya que al ser inestable en agua este llega a perder efecto a partir de los 20 a 30 min.

13 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdel-Monaim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M., & Morsy, K. M. (2011). Eficacia de los extractos de plantas en la supresión de las enfermedades de marchitez y marchitez del altramuz (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Protection*, 30(2), 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.016>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Elsevier. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=CnzbgZgby60C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Plant+pathology.+5th+ed&ots=Fszrxd_Fke&sig=O21anzNY3i0NZneH346YRl0ZhSM#v=onepage&q=Plant%20pathology.%205th%20ed&f=false
- Albán, A. M. (2021). *Alternativas para la reducción de Fusarium sp en el cultivo de alelí (Matthiola incana), utilizando técnicas de control fitosanitario establecidas en la finca Gemmolles S.A., Cotopaxi*. [masterThesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; UTC.]. <http://localhost/handle/27000/7616>
- Avilés, L. E. (2022). *Uso de ozono para desinfección de suelos en el cultivo de banano (Musa x paradisiaca) en el Ecuador* [bachelorThesis, BABAHOYO: UTB, 2022]. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/13233>
- Benintende, S., & Sánchez, C. (2000). *Microorganismos del suelo*. Universidad Nacional de Entre. http://www2.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/parte_de_unidades_10_y_11_microorganismos_del_suelo.pdf
- Bonelo, L. Y., Chavarro, L. Y. B., & Leal, L. C. S. (2020). Control biorracional de hongos del género *Fusarium*. *Biociencias (UNAD)*, 2(1), 1–19.

- Cabrera, R., Palafox, S., & Valenzuela, A. I. (2019). *ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL HONGO FITOPATÓGENO FUSARIUM EN EL SECTOR AGRÍCOLA: DEL CONTROL QUÍMICO AL CONTROL BIOLÓGICO*. 8.
- Carnicer, J. M. (2008). *Módulo I: Contaminación Ambiental CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA* [Master en Ingeniería Medioambiental y Gestión del Agua, Escuela de Negocios].
<https://www.eoi.es/sites/default/files/savia/documents/componente45257.pdf>
- Castellanos, G., Jara, C. E., & Mosquera Cifuentes, G. M. (2011). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. *CIAT No. 375*, 242.
- Castro, F., & Dávalos, G. (1990). Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(3), 454–463.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-5>
- Chonata, E. B. (2018). *Efecto de la aplicación postcosecha de ozono gaseoso sobre la tasa respiratoria y la calidad microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)* [bachelorThesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica].
<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/29054>
- Concepción, L. E. (2016). Evolución temporal de concentración de ozono en la troposfera. *Repositorio de Tesis - UNMSM*.
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/5042>
- Elbehri, A., Germán, C., Almudena, C., & Skully, D. (2015). *Cambio climático y sostenibilidad del banano en el Ecuador: Evaluación de impacto y directrices de política*. 198.
- Fallas, J. (2012). *ANÁLISIS DE VARIANZA*. 54.

- Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum and its biocontrol—Fravel—2003—New Phytologist—Wiley Online Library*. New Phytologist. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1469-8137.2003.00700.x>
- Gayosso, O., López, A., Marroquín, J. Á., López, K., Hidalgo-Ramos, D. M., Chávez, G., & Gayosso, O. (2021). Evaluación de la respuesta de diferentes genotipos de tomate a *Fusarium oxysporum* raza 3. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(3), 409–420. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2284>
- Gómez, D., Salazar, J., & Vargas, A. (2019). *Impacto del desbalance en los tamaños de muestra por tratamiento sobre el desempeño de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey*. 1(2), 93.
- Gómez, E. D. (2008). *Caracterización de cepas toxigénicas del género fusarium mediante técnicas de biología molecular* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universitat Politècnica de València]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=18240>
- González, H. (2018). “*DINÁMICA TEMPORAL DE Fusarium spp. ASOCIADO A LA MARCHITEZ DE LA VAINILLA (Vanilla planifolia Jacks.), EN LA REGIÓN DEL TONACAPAN, VERACRUZ*” [Postgrado, INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS]. http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/3273/Gonzalez_Reyes_H_MC_Fitopatologia_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Guisha, W. D. (2018). “*DETERMINACIÓN DE DOS DOSIS DE OZONO (O3) CON 2 FRECUENCIAS PARA EL CONTROL DE DAMPING OFF (Phytium, Fusarium*

oxysporum, Phytophthora) EN AMARANTO (*Amaranthus caudatus*) EN PILONERAS SALACHE. LATACUNGA. COTOPAXI. 2019. 96.

LaMondia, J. A. (2015). Fusarium wilt of tobacco. *Crop Protection*, 73, 73–77.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.03.003>

Latorre, A. (2017). *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para evaluar la incidencia y la estabilidad de micotoxinas del género Fusarium en forrajes de maíz ensilados* [Doctoral thesis, Universidad de Santiago de Compostela].

<https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/15456>

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium Laboratory Manual* (1a ed.). John

Wiley

&

Sons.

https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Fusarium+laboratory+manual.&ots=3M_b5IXmWo&sig=fCOkB

[D0KQrNEvJGa7Uhy6JfAbOw#v=onepage&q=The%20Fusarium%20laboratory](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Fusarium+laboratory+manual.&ots=3M_b5IXmWo&sig=fCOkB)

[%20manual.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Fusarium+laboratory+manual.&ots=3M_b5IXmWo&sig=fCOkB)

[%20manual.&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Yu3cBAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Fusarium+laboratory+manual.&ots=3M_b5IXmWo&sig=fCOkB)

Martínez, G. E., Rey, J. C., Pargas, R. E., & Manzanilla, E. E. (2019). Marchitez por

Fusarium raza tropical 4: Estado actual y presencia en el continente americano.

Agronomía Mesoamericana, 259–276. <https://doi.org/10.15517/am.v31i1.37925>

Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos Douglas C. Montgomery*.

700.

Mosqueira, M., Almedra, R., Escobar, E., & Dianee, J. (2021). EFECTIVIDAD

ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL HIPOCLORITO DE SODIO 5%;

CLORHEXIDINA 5% Y AGUA OZONIZADA; FRENTE AL ENTEROCOCCUS

FAECALIS, CUSCO-202. 38–78.

- Ortiz C., E., & Hoyos C., L. M. (2012). Descripción de la sintomatología asociada a fusariosis y comparación con otras enfermedades en gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6(1), 110–116.
- Palacios, E. A. (2020). *EFFECTO DE ACEITE OZONIZADO SOBRE EL CRECIMIENTO RADIAL DE FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. CUBENSE RAZA TROPICAL 1 (FOC-RT1)* [Tesis de Grado, UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL]. <https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/ca303943-05d0-4266-809b-8175ac61702f/content>
- Román, V. P. (2023). *Efecto del uso de ozono en el control de antracnosis (Colletotrichum sp.) en poscosecha de papaya (Carica papaya L.)* [Trabajo de titulación, Universidad Central del Ecuador]. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/3b5308a4-cf5f-429e-bf70-4074e2fd0da0/content>
- Rubio, G. L., Baltodano, F. de M., Abanto, L. I., Wilson, J. H., & Muñoz, M. A. (2008). *Resist en CIA in Vitro de Rhizoctonia Solani y Fusarium Oxysporum A Los Fungi Cid As Benzomil 500—Rhizolex-T y Homai-WP | PDF | Concentración | Hongo*. Scribd. <https://es.scribd.com/document/63156308/Resist-en-CIA-in-Vitro-de-Rhizoctonia-Solani-y-Fusarium-Oxysporum-a-Los-Fungi-Cid-As-Benzomil-500-Rhizolex-T-y-Homai-WP>
- Rubio, M.-J., & Berlanga, V. (2012). Com aplicar les proves paramètriques bivariades t de Student i ANOVA en SPSS. Cas pràctic. *REIRE Revista d'Innovació i Recerca en Educació*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.1344/reire2012.5.2527>

- Samaniego, C. P. (2022). "EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE AGUA OZONIFICADA A DOS DOSIS EN PITAHAYA". 90.
- Sánchez, C. D. (2022). *Identificación de microorganismos mediante la captura en dos terrazas agrícolas en el Campus Salache, Latacunga, Cotopaxi*. [bachelorThesis, Ecuador: Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <http://localhost/handle/27000/9604>
- Tsutomu, A. (2019). *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science*, 44(4), 275–281. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>
- Vida Sana. (2014). *Microorganismos del suelo y biofertilización*. Asociación Vida Sana. https://cultivos-tradicionales.com/upload/file/dossier-5_microorganismos-del-suelo-y-biofertilizacion-2.pdf
- Vidal, F. J. R. (2003). *Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización*. Ediciones Díaz de Santos.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, H. A., Basurto, M., Soto, J. M., & Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. Y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
- Villaverde, J. (2018, junio 14). *Fusarium*. Todo lo que necesitas saber sobre este género. *Plantamus*. <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>
- Wyckhuys, K. A. G., Fuentes, L. S., Niño, N. E., Espinosa, L., De Vis, R., & Escobar, H. (2010). *Manejo integrado de plagas y enfermedades. Manual de producción de tomate bajo invernadero*. Editorial Tadeo Lozano. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6QZHEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=>

PA85&dq=La+propagaci%C3%B3n+del+pat%C3%B3geno+fusarium+se+pued
e+controlar+de+alguna+manera+mediante+el+uso+de+semillas+limpias+y+la+
eliminaci%C3%B3n+de+los+tejidos+de+plantas+infectadas+del+%C3%A1rea,
+aunque+la+estrategia+de+manejo+m%C3%A1s+efectiva+es+sembrar+varieda
des+resistentes&ots=Jmzu2eWpFs&sig=081xXS5Gmx_U55y__FMK78Upotk#
v=onepage&q&f=false

