

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Biología



TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Estudios ecotoxicológicos en diferentes bioindicadores ambientales del bioplaguicida Tricosave-34

Autor: Lázaro Hernández Sorí

Tutor: MSc. Osmany Marrero Chang

"Año 56 de la Revolución"

Curso: 2013-2014

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Estudios ecotoxicológicos en diferentes bioindicadores ambientales del bioplaguicida Tricosave-34

Autor: Lázaro Hernández Sorí

e-mail: lhsori@uclv.edu.cu

Tutor: MSc. Osmany Marrero Chang

Investigador Agregado

Centro de Bioactivos Químicos.

e-mail: omarrero@uclv.edu.cu

"Año 56 de la Revolución"

Curso: 2013-2014

Pensamiento:

“Debemos desarrollar tecnologías que nazcan de las condiciones concretas de nuestro suelo, de nuestras materias primas, de nuestro ambiente cultural, de acuerdo con la inventiva y la ciencia de nuestros propios tecnólogos.”

Ernesto Che Guevara de la Serna

Agradecimientos:

En este apartado quiero agradecer a todos los que de una forma u otra contribuyeron durante el desarrollo de este trabajo.

En primer lugar agradecer de forma muy especial a mi tutor Osmany Marrero Chang por acogerme en su laboratorio y brindarme su experiencia y apoyo en todo momento.

A todos mis profesores por el conocimiento brindado y contribuir a mi formación profesional.

A mis compañeros de carrera y en especial a los 23 que llegamos hasta el final por permitirme ser uno más de la familia durante estos cinco años.

A mi familia en general: mis padres Marbelis y Lázaro, a mis abuelos, a mi hermana, a mis primos, a mis tíos (especial) que de una forma u otra todos contribuyeron con mi formación como profesional.

A los compañeros del departamento de Parasitología y Toxicología del CBQ, especialmente a Héctor Serrano, Alcides Morales, Edisleidy Águila Jiménez, Mirieisy Seijo Wals, Guillermo Alonso Toledo y a todo aquel que brindó su granito de arena para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos de la carrera de Ingeniería Agrícola por estar presente en los momentos buenos y malos brindándome su apoyo y consejos.

A aquellos profesores y amigos de la facultad que me han brindado su ayuda y en muchos casos su amistad.

Y finalmente a todos aquellos que de una u otra forma han contribuido a mi equilibrio emocional y profesional durante estos cinco años o me han dado su apoyo en la realización de este trabajo de tesis.

Finalmente, quiero usar esta oportunidad para expresar mi eterno agradecimiento a mi amada familia por todo el amor que me ofrecen diariamente.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS,

Lázaro Hernández Sorí

Resumen

En el presente trabajo se abordan y analizan los resultados de la evaluación ecotoxicológica en diferentes organismos bioindicadores del ambiente realizados al bioplaguicida Tricosave-34, desarrollado por el Grupo Empresarial Labiofam para el control de plagas producidas por algunos nematodos y hongos de varios cultivos. El producto consistió en una mezcla sólida granulada compuesta por sustrato inerte a base de residuos de arroz (punta y cáscara) y conidios de la Cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai. Se realizaron las evaluaciones a dosis única en los organismos *Lactuca sativa*, *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Apis mellifera* y *Eisenia foetida*. Los principales indicadores considerados en cada especie fueron mortalidad y signos subletales. Se monitoreó cuando fue necesario la presencia y/o persistencia del hongo en el caso de modelos en el medio acuático o en el alimento en el caso de la abeja melífera. Se demostró la persistencia y/o presencia de la forma de vida del hongo (conidios) en el medio acuático de peces y moluscos en ensayo y en el alimento de abejas melíferas. Los resultados demostraron la seguridad del Tricosave-34 por la muy baja toxicidad, solo demostrada en la especie *Lactuca sativa* y a concentraciones de conidios muy superiores a las previstas para uso en agricultura. En las especies *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Apis mellifera* y *Eisenia foetida* no se demostró evidencia de toxicidad. Considerando los resultados obtenidos se pueden realizar subsiguientes estudios de seguridad que de forma lógica son necesarios al ofrecer suficientes elementos de calidad, eficacia y seguridad para la posterior conformación del expediente de solicitud de registro sanitario como bioplaguicida para su futura comercialización y utilización en cultivos.

Palabras claves: *Trichoderma harzianum*, bioplaguicida, evaluación ecotoxicológica, *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Apis mellifera*, *Eisenia foetida*, *Lactuca sativa*.

Abstract:

The results of ecotoxicological assessment in different ecological organisms of microbial pesticide Tricosave-34 are address and analize. This biopesticide was developed by Labiofam for control pests and some nematodes starting from *Trichoderma harzianum*. The product consisted of a solid mixture composed of inert granular substrate based on rice residue (tip and peel) and conidia of the strain A-34 of *Trichoderma harzianum* Rifai. Single dose evaluation in *Lactuca sativa*, *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Apis mellifera* and *Eisenia foetida* organisms were performed. The main indicators considered in each species were mortality and sub lethal signs. Persistence of the fungus in the aquatic environment of fish and mollusk and in food of honey bees was demonstrated. The safety of Tricosave-34 was demonstrated due to a very low toxicity, only in *Lactuca sativa* at concentrations much higher than those provided for agricultural use. In *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Eisenia foetida* and *Apis mellifera* any evidence of toxicity was not demonstrated. Considering the results obtained we recommend developing subsequent safety studies that are logically necessary to provide sufficient evidence of quality, efficacy and safety for dossier application and licensing as a biopesticide for use in future marketing and crops.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, biopesticide, ecotoxicological assessment, *Poecilia reticulata*, *Physa cubensis*, *Apis mellifera*, *Eisenia foetida*, *Lactuca sativa*.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| <i>Hipótesis</i> | 3 |
| <i>Objetivo general</i> | 3 |
| <i>Objetivos específicos</i> | 3 |
| 2. Ecotoxicología | 4 |
| 2.1 Situación actual, medio ambiente y cuestiones toxicológicas..... | 4 |
| 2.2 Ecotoxicología y evaluación de riesgo ambiental..... | 5 |
| 2.3 Bioensayos en Ecotoxicología..... | 7 |
| 2.4 Aplicación de la Ecotoxicología..... | 9 |
| 2.5 Plaguicidas..... | 10 |
| 2.5.1 Definición | 11 |
| 2.5.2 Clasificación | 12 |
| 2.5.3 Uso..... | 16 |
| 2.5.4 Aspectos toxicológicos..... | 17 |
| 2.6 Bioplaguicidas..... | 20 |
| 2.6.1 Utilidades..... | 23 |
| 2.6.2 Las desventajas de los bioplaguicidas..... | 23 |
| 2.6.3 Control biológico: el uso de bioplaguicidas..... | 24 |
| 2.6.4 Registro de bioplaguicidas microbianos..... | 25 |
| 2.6.5 Elementos de bioseguridad en la producción de bioplaguicidas. Buenas Prácticas de producción y diseño de instalaciones..... | 28 |
| 2.6.5.1 Grupos de riesgos y particularidades | 28 |
| 2.7 <i>Tricoderma</i> | 29 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.7.1 | <i>Trichoderma harzianum</i> | 32 |
| 2.7.2 | Hábitat..... | 32 |
| 2.7.3 | Características..... | 32 |
| 2.7.4 | Morfología..... | 32 |
| 2.7.5 | Aplicaciones..... | 32 |
| 2.7.6 | Modo de acción..... | 33 |
| 2.7.7 | Ventajas de su aplicación..... | 33 |
| 3. | Materiales y métodos | 34 |
| 3.1 | Vehículo..... | 34 |
| 3.2 | Preparación de la sustancia de ensayo..... | 34 |
| 3.3 | Ensayos ecotoxicológicos..... | 35 |
| 3.3.1 | Ensayo de germinación y elongación de la raíz en lechuga | 35 |
| 3.3.1.1 | Métodos..... | 35 |
| 3.3.1.2 | Fundamentación del biomodelo empleado..... | 35 |
| 3.3.1.3 | Sistema de ensayo..... | 35 |
| 3.3.1.4 | Condiciones de mantenimiento..... | 36 |
| 3.3.1.5 | Distribución y formación de grupos experimentales..... | 36 |
| 3.3.1.6 | Vía de administración, dosis, frecuencia y duración..... | 36 |
| 3.3.1.7 | Estudio anatomopatológico..... | 37 |
| 3.3.1.8 | Análisis estadístico..... | 37 |
| 3.3.2 | Ensayo en lombriz terrestre | 37 |
| 3.3.2.1 | Métodos..... | 37 |
| 3.3.2.2 | Fundamentación del biomodelo empleado..... | 37 |
| 3.3.2.3 | Sistema de ensayo..... | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.2.4 | Condiciones de mantenimiento y alimentación..... | 38 |
| 3.3.2.5 | Distribución y formación de grupos experimentales..... | 38 |
| 3.3.2.6 | Vía de administración, dosis, frecuencia y duración..... | 39 |
| 3.3.2.7 | Observaciones clínicas..... | 39 |
| 3.3.2.8 | Eutanasia..... | 39 |
| 3.3.2.9 | Análisis estadístico..... | 39 |
| 3.3.3 | Ensayo en moluscos | 40 |
| 3.3.3.1 | Métodos..... | 40 |
| 3.3.3.2 | Fundamentación del biomodelo empleado..... | 40 |
| 3.3.3.3 | Sistema de ensayo..... | 40 |
| 3.3.3.4 | Condiciones de mantenimiento y alimentación..... | 41 |
| 3.3.3.5 | Condiciones ambientales..... | 41 |
| 3.3.3.6 | Distribución y formación de grupos experimentales..... | 41 |
| 3.3.3.7 | Vía de administración, dosis, frecuencia y duración..... | 42 |
| 3.3.3.8 | Observaciones clínicas..... | 42 |
| 3.3.3.9 | Eutanasia..... | 43 |
| 3.3.4 | Ensayo en abejas melíferas | 43 |
| 3.3.4.1 | Métodos..... | 43 |
| 3.3.4.2 | Fundamentación del biomodelo empleado..... | 43 |
| 3.3.4.3 | Sistema de ensayo..... | 43 |
| 3.3.4.4 | Condiciones de mantenimiento y alimentación..... | 44 |
| 3.3.4.5 | Distribución y formación de grupos experimentales..... | 44 |
| 3.3.4.6 | Vía de administración, dosis, frecuencia y duración..... | 44 |
| 3.3.4.7 | Observaciones clínicas..... | 44 |
| 3.3.4.8 | Eutanasia..... | 45 |
| 3.3.4.9 | Estudio microbiológico..... | 45 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.3.4.10 | Análisis estadístico..... | 45 |
| 3.3.5 | Ensayo en peces guppy..... | 45 |
| 3.3.5.1 | Métodos..... | 45 |
| 3.3.5.2 | Fundamentación del biomodelo empleado..... | 46 |
| 3.3.5.3 | Sistema de ensayo..... | 46 |
| 3.3.5.4 | Condiciones de mantenimiento y alimentación..... | 46 |
| 3.3.5.5 | Condiciones ambientales..... | 47 |
| 3.3.5.6 | Distribución y formación de grupos experimentales..... | 47 |
| 3.3.5.7 | Vía de administración, dosis, frecuencia y duración..... | 47 |
| 3.3.5.8 | Observaciones clínicas..... | 47 |
| 3.3.5.9 | Peso corporal..... | 48 |
| 3.3.5.10 | Eutanasia..... | 48 |
| 3.3.5.11 | Estudio microbiológico..... | 48 |
| 3.3.5.12 | Análisis estadísticos..... | 48 |
| 4. | Resultados..... | 50 |
| 4.1 | Ensayo de germinación y elongación de la raíz en lechuga..... | 50 |
| 4.2 | Ensayo en lombriz..... | 51 |
| 4.3 | Ensayo en moluscos..... | 52 |
| 4.4 | Ensayo en abejas..... | 55 |
| 4.5 | Ensayo en peces..... | 57 |
| 5. | Discusión..... | 62 |
| 5.1 | Planta..... | 62 |
| 5.2 | Lombriz..... | 63 |
| 5.3 | Molusco..... | 63 |
| 5.4 | Abeja..... | 63 |
| 5.5 | Peces..... | 64 |
| 6. | Conclusiones..... | 67 |
| 7. | Recomendaciones..... | 68 |

1. Introducción

La contaminación antropogénica de ambientes naturales, independientemente de las razones que la motiven, puede producir efectos negativos en organismos y ecosistemas. Los agroquímicos, y en particular los plaguicidas, han llegado a ser una parte integral de los sistemas modernos de agricultura, contribuyendo significativamente a mejorar el rendimiento de las cosechas, pero a su vez han generado indeseables efectos en el medio ambiente (Pimentel, 1998).

El uso de plaguicidas en la práctica agrícola es una prueba del efecto que tiene la “química” sobre la “salud” de los compartimentos ambientales, la biota asociada y el ecosistema, pues aunque permitió eliminar plagas de forma relativamente eficiente trajo aparejado efectos desfavorables sobre la fauna beneficiosa. Son estos efectos los que catalizaron el desarrollo de la toxicología ambiental y con ello el desarrollo de pruebas que miden indicadores de importancia ecológica en diferentes taxas.

Una de las vías de reducir el empleo de plaguicidas químicos es la introducción de microorganismos ya que como componentes naturales del ambiente, con amplia diversidad y posibilidad de crear epizootias, logran mantener las plagas y enfermedades por debajo del umbral de daño. En este grupo los hongos sobresalen por sus potencialidades, sin embargo, el uso en la práctica agrícola se ve limitada por el insuficiente conocimiento de su modo de acción, la producción de metabolitos, los eventos que afectan su actividad y la seguridad de su uso.

No obstante, la introducción de cualquier organismo viviente en el ambiente es a menudo un paso irreversible por lo que debe hacerse con cautela, para que el organismo no interfiera con el funcionamiento natural de otros agentes de control de plagas, y/o cause toxicidad en las especies no-diana que cohabitan en el ambiente. De ahí que, la seguridad de los hongos utilizados en el control biológico deba ser considerada a todos los niveles, sobre todos los miembros del ecosistema y sobre el ecosistema mismo (Hajek y Goettel, 2000).

Los plaguicidas de origen biológico, generalmente proporcionan una opción medioambiental benigna para el control de plagas, pero eso no significa que están libres de riesgos para la salud y el ambiente. De hecho, los microorganismos de estos preparados, además del efecto para organismos no-diana (toxicidad, patogenicidad, desplazamiento competitivo y alergenicidad), pueden tener el riesgo de infectar vertebrados e invertebrados. Es

indiscutible que el conocimiento de los posibles efectos tóxicos, debe ser considerado como requisito para el registro y utilización de cualquier bioplaguicida.

El amplio rango de sensibilidades de las diferentes especies de organismos hace recomendable utilizar una serie de especies en las evaluaciones de toxicidad ambiental.

Antes de 1996, los métodos de evaluación de los microorganismos estaban basados en los protocolos de los plaguicidas químicos; no obstante estos tenían limitaciones que conllevaron a la adopción de un nuevo sistema (Serie OPPTS 885 de la Agencia de Protección Ambiental-EPA) que refleja una mejor comprensión de los datos necesarios para los productos microbianos.

Nuestro país no está ajeno a esta problemática por lo que ha adoptado metodologías establecidas en guías de países europeos o de la Agencia para la Protección Ambiental (por las siglas en inglés EPA) de los Estados Unidos para evaluar el impacto ecotoxicológico. Este gran grupo de pruebas evalúa efectos sobre organismos no-diana entre los que se incluyen plantas, peces, artrópodos beneficiosos, aves y mamíferos, aunque como es lógico siempre se aceptan otros organismos de los ecosistemas que potencialmente serán expuestos, siempre que estén bien representados en dichos sistemas.

El biopreparado Tricosave-34 pertenece a esta categoría de compuestos pues su componente activo es la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai, cuya aplicabilidad como control biológico se debe a sus acciones contra hongos fitopatógenos. *Trichoderma* es un hongo filamentoso propio del suelo, capaz de adaptarse a varios ambientes (Druzhinina, 2005) e interactuar con raíces, suelos y ambientes foliares (Ranasingh *et al.*, 2006; Reino *et al.*, 2008) lo que condiciona que varias especies del género tengan reconocimiento por su habilidad de incrementar el crecimiento y desarrollo de las raíces, la resistencia al estrés biótico y la captación y uso de nutriente (Ranasingh *et al.*, 2006). Este producto no tiene del todo caracterizado su ecotoxicidad e impacto ambiental.

Por ser Cuba un país eminentemente agrícola, no ha sido ajeno a la tendencia mundial a incrementar la producción y empleo de agentes fitosanitarios de origen químico o biológico. Importantes impactos ambientales recaen en este sector, demandando la búsqueda racional de compuestos ecológicamente más compatibles. La transición hacia métodos alternativos de control, como aquellos basados en el control biológico ha disparado la producción y aplicación de bioplaguicidas y biofertilizantes.

Hipótesis

Los estudios ecotoxicológicos del producto bioplaguicida Thricosave-34 permitirán conocer sus posibles efectos sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres como medida del impacto ambiental al ser utilizado extensivamente en diferentes cultivos.

Objetivo general

1. Evaluar la ecotoxicidad del Tricosave-34 sobre organismos de diferentes compartimentos ambientales.

Objetivos específicos

1. Determinar la toxicidad aguda del bioplaguicida Tricosave-34, sobre lombrices de tierra.
2. Evaluar la toxicidad aguda infectividad oral en abejas *Apis mellifera* del bioplaguicida Tricosave-34 (*Trichoderma harzianum*).
3. Evaluar la toxicidad aguda infectividad/patogenicidad en *Physa cubensis* del plaguicida microbiológico Tricosave-34 (*Trichoderma harsianum*).
4. Determinar la toxicidad aguda infectividad/patogenicidad en *Poecilia reticulata* (Guppy) del plaguicida microbiológico Tricosave-34 (*Trichoderma harsianum*).
5. Determinar la toxicidad aguda del bioplaguicida Tricosave-34, sobre la germinación y elongación de la raíz en semillas de lechuga *Lactuca sativa*.

2. Ecotoxicología

2.1 Situación actual, medio ambiente y cuestiones toxicológicas

La preocupación sobre los posibles efectos ecológicos de los contaminantes comenzó a expandirse entre los años 1950 y 1960. Es así que surge la ecotoxicología, como ciencia que estudia los efectos ecológicos de los contaminantes, con particular énfasis en la toxicidad directa sobre los organismos y las alteraciones del medio ambiente en el cual viven estos organismos (Truhaut, 1986).

Los contaminantes químicos generados y vertidos al ambiente pueden causar efectos muy variados, ya sea sobre los organismos aislados (efectos tóxicos), o sobre los ecosistemas y el equilibrio ambiental general (efectos ecotóxicos) los cuales pueden ser inmediatos o a largo plazo y afectar generaciones posteriores. Así como efectos adversos de tipo estético, económico, social y político. Por lo general ocurren en lugares cercanos a la fuente de contaminación (efectos microambientales). También pueden ocurrir en sitios remotos y tienen mayormente implicaciones globales (efectos macroambientales).

La evaluación medioambiental es un concepto de gran importancia y a la vez muy complejo. Son muy numerosos los métodos existentes para llevar a cabo el muestreo y el análisis de muestras ambientales, recurriéndose habitualmente a criterios internacionales de orígenes diversos. La evaluación implica la utilización de numerosas herramientas con el objetivo último de conocer y valorar una situación, permitiendo el posterior planteamiento de actuaciones. Los métodos concretos y técnicas más usadas en la determinación de los parámetros más significativos en el análisis medioambiental son los métodos físico-químicos y los métodos biológicos. Dentro de los métodos físico-químicos se emplean técnicas químicas y técnicas instrumentales.

Por métodos biológicos de análisis medioambiental podríamos entender todos aquellos métodos que emplean organismos vivos o elementos de éstos con el fin de evaluar la contaminación de un entorno concreto. Se pueden establecer tres grandes grupos de ensayos biológicos:

- Ensayos toxicológicos.
- Exámenes microbiológicos.

- Análisis biológico en sentido estricto

Los ensayos toxicológicos tienen por objeto establecer los efectos desfavorables que produce la dosis de un determinado residuo sobre un organismo concreto durante un tiempo establecido. Los exámenes microbiológicos pretenden determinar la presencia en un medio concreto de agentes peligrosos o potencialmente peligrosos para la salud humana. El análisis biológico de un entorno tiene por objeto establecer el tipo y estado en que se encuentran las comunidades biológicas que lo habitan, y de este modo poder evaluar la calidad ambiental de dicho medio.

En este ámbito, en las últimas décadas se han incrementado las investigaciones con vistas a elevar el control y la evaluación toxicológica de estos productos, así como al análisis de su interacción con el medio. Así, ha surgido una nueva rama de la toxicología, la Ecotoxicología, la cual se define como una ciencia que se ocupa del estudio de los efectos tóxicos de agentes químicos y físicos en organismos vivientes, ya sea animales o plantas, en ecosistemas definidos o en parte de ellos (Truhaut, 1986). Teniendo en cuenta todos los efectos potenciales, dentro de los grupos taxonómicos principales a ser considerados cuando se quieren establecer criterios de riesgo terrestre se incluyen los invertebrados. La actividad de los invertebrados es importante para la dinámica de los ecosistemas terrestres. Las guías de ensayos con invertebrados incluyen especies representantes de los más importantes niveles tróficos y también contemplan rutas diferentes de exposición.

2.2 Ecotoxicología y evaluación de riesgo ambiental

Las pruebas utilizadas para determinar el efecto tóxico de las sustancias químicas se han enfocado tradicionalmente en el aspecto de la seguridad hacia el ser humano. Tales pruebas son llevadas a cabo, invariablemente, usando especies sucedáneas que se supone se aproximan a la respuesta humana. A través de varios años se ha acumulado suficiente información confiable que provee datos que pueden ser extrapolados a la protección de la salud humana. Esta información se basa en estudios que utilizan diferentes especies, tales como ratones, ratas, conejos, perros y ocasionalmente primates (Menzer, R., *et.al* 1994).

Recientemente ha surgido una importante consideración en Toxicología que demanda una extensión de los limitados protocolos del pasado: se reconoce que hay implicaciones importantes para la salud humana en la respuesta de los animales a los xenobióticos en su

propio ambiente así como su relación con las vías y procesos de incorporación de éstos. Es entonces que surgen las subdisciplinas Toxicología ambiental y Ecotoxicología (Menzer, R., *et.al.* 1994). Éstos son términos usados para describir el estudio científico de los efectos adversos sobre los organismos que pueden ocasionar las sustancias químicas cuando son liberadas en el ambiente. La Toxicología ambiental se aplica solamente al estudio de los efectos directos de las sustancias en el ser humano mientras que la Ecotoxicología provee un significado de la valoración del riesgo de las poblaciones naturales de organismos cuando son expuestas a un estrés ambiental tal como la presencia de un contaminante o la mezcla de ellos y la influencia que las condiciones ambientales tienen sobre el comportamiento del tóxico. (Holloway, G., *et.al.* 1997; Sköt, 1995).

La ecotoxicología la podemos definir como la ciencia que se encarga de estudiar los efectos de las sustancias químicas sobre las estructuras y función de los ecosistemas. De hecho, valorar y predecir efectos sobre estructuras altamente complejas es sin duda una tarea difícil de desarrollar y es por ello, que se han diseñado modelos de valoración de riesgos que nos permiten predecir situaciones adversas sobre el medio ambiente producto de la liberación de sustancias químicas, en este caso de plaguicidas.

La Evaluación de Riesgo Ambiental, ERA, es un buen mecanismo para la toma de decisiones en este campo, la cual se aplica como metodología en los Estados Unidos, USEPA, 1998, y en los países de la Comunidad Europea, directiva 414, CEE.

Los procedimientos de Evaluación de Riesgo Ambiental, se basan en los criterios de no efecto, en donde se considera que la utilización de los plaguicidas debe regularse, a modo que se evite la aparición de efectos adversos sobre el medio ambiente, el planteamiento ecotoxicológico extrapola al campo ambiental un axioma que establece que la mayoría de las curvas que relacionan la dosis o concentración del tóxico a que se ve sometido un individuo, con la respuesta que en él se produce tienen forma sigmoidea, la extrapolación se basa en utilizar la información existente para determinar las dosis o concentraciones para la cual no hay efectos, considerando la calidad y cantidad de la información disponible, la Evaluación de Riesgo Ambiental, ERA, permite establecer los límites de aceptabilidad mediante procedimientos científicos basados en la información disponible.

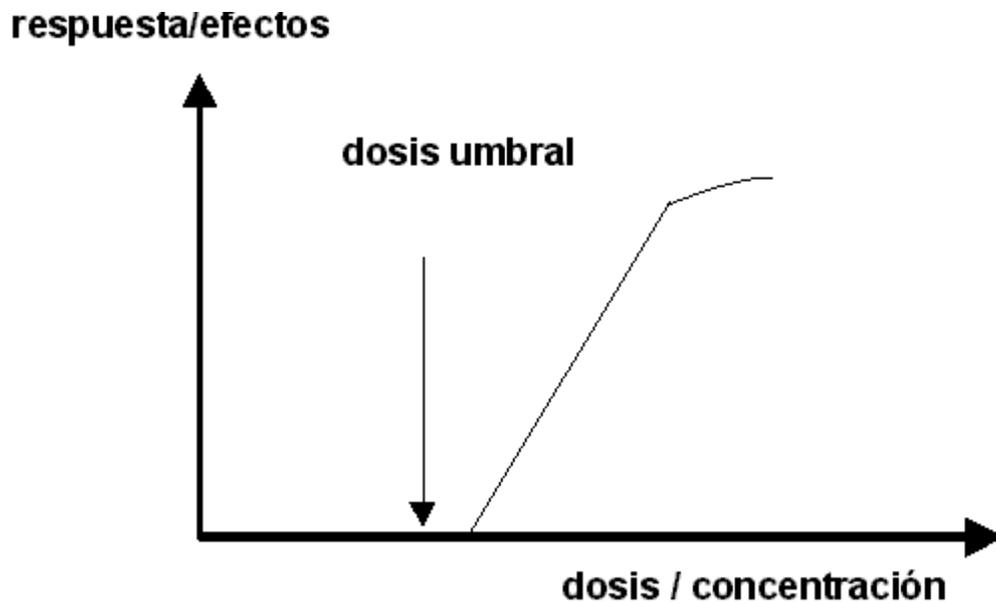


Gráfico # 1. Curva de relación dosis-efecto

La tendencia en Ecotoxicología es la prueba de una batería de organismos a partir de diferentes niveles tróficos: descomponedores (microorganismos), productores primarios (algas y plantas), productores secundarios y consumidores (invertebrados y vertebrados). Esta consideración es particularmente útil para valorar contaminantes desconocidos, mezclas complejas y residuos peligrosos, debido a que alguno de sus componentes puede afectar solamente a un nivel trófico o puede biomagnificarse (Wang, W., *et.al.* 1994).

2.3 Bioensayos en Ecotoxicología

En Ecotoxicología, un bioensayo o prueba de toxicidad es una técnica empleada para determinar si un residuo químico presente en el ambiente está en cantidades suficientemente altas para afectar adversamente algunos aspectos del espectro normal de actividades de animales y plantas. Los bioensayos en Ecotoxicología se realizan con el supuesto de que los organismos probados son “sucedáneos” o “claves” de organismos “superiores” presentes en su ambiente natural (Colin, 1993).

La Ecotoxicología está basada en el principio de que hay una relación directa entre la reacción tóxica (la respuesta) y la cantidad de sustancia recibida (la dosis). Un supuesto importante de esta relación es que existe una dosis a la cual no ocurre respuesta, el segundo supuesto es que una vez que la dosis máxima ha sido alcanzada cualquier incremento en ésta no resultará en un incremento del efecto (US-EPA, 1998).

El término toxicidad se refiere al potencial inherente de una sustancia para causar daño sistémico a los organismos. Los efectos tóxicos se clasifican en agudos y crónicos. Los efectos agudos suceden inmediatamente después de una sola exposición a la sustancia a concentraciones generalmente altas (muerte, parálisis, inhibición de crecimiento); los efectos crónicos se presentan después de un largo tiempo de exposición y proporcionan una respuesta subletal (cáncer, daño a los órganos, dificultad en la reproducción). Las pruebas de toxicidad aguda son relativamente simples, son de corta duración y de bajo costo, además de que se cuenta con bases de datos para muchas sustancias y efluentes. Estas pruebas usadas con frecuencia para una valoración de toxicidad rápida o para determinar la sensibilidad relativa de diferentes especies. Las pruebas de toxicidad crónica son más complejas y requieren más tiempo que las de toxicidad aguda; éstas son diseñadas para ciclos de vida de especies particulares con la finalidad de obtener información de teratogenicidad (capacidad de la sustancia para producir malformaciones en el organismo) (Menzer, R., *et.al.*1994). Si la valoración de toxicidad está basada en estudios en animales, el grado de daño a los humanos pueden extrapolarse usando modelos matemáticos basados en una gran variedad de supuestos. Entonces la valoración de toxicidad provee solamente un estimado del daño al ser humano.

Las normas de regulación ambiental se basan en resultados obtenidos mediante bioensayos, los cuales, para considerarse válidos deben ser evaluados en base a las siguientes preguntas sugeridas por Tebo (Colin, 1993).

¿Qué significa la respuesta del bioensayo en términos de daño ambiental?

¿La respuesta del laboratorio puede extrapolarse al sistema receptor (ecosistema)?

¿El bioensayo es suficientemente sensible?

¿La precisión de la prueba es conocida?

¿El bioensayo es simple y reproducible?

Con la inclusión de especies adicionales en los bioensayos se ha visto la necesidad de desarrollar nuevos protocolos estandarizados. Cuando se aumenta el número de especies probadas en la valoración de la toxicidad de una sustancia, se es capaz de formar una idea de su mecanismo de acción, biodegradabilidad, toxicidad específica para cada órgano y efectos potenciales tanto agudos como crónicos (Menzer, R., *et.al.*1994). Sabiendo que los

estudios de ecotoxicidad se realizan usando los bioensayos, entonces se puede definir el papel de la Ecotoxicología en la valoración del riesgo ambiental.

2.4 Aplicación de la Ecotoxicología

Un objetivo importante de los bioensayos es valorar el impacto sobre los ecosistemas naturales y calcular los factores de riesgo. Las poblaciones naturales de animales y plantas son todas, sin excepción, expuestas frecuentemente a residuos tóxicos derivados de las actividades humanas tales como pesticidas, detergentes, metales pesados y de la transformación del petróleo. Una consideración importante para evaluar el riesgo al que un organismo puede estar bajo exposición de un tóxico es valorar la concentración letal 50 que se define como la concentración a la cual muere el 50% de la población (LC50) o la concentración efectiva media que es la concentración a la que disminuye en un 50% el efecto observado (EC50) bajo las condiciones de laboratorio. Un simple análisis de riesgo ecotoxicológico puede realizarse por extrapolación de datos de toxicidad aguda o crónica de pruebas con varias especies utilizando técnicas estadísticas de regresión.

Alternativamente, los procedimientos de extrapolación del laboratorio al campo pueden usar modelos de distribución para conjuntos de datos de pruebas de toxicidad aguda o crónica. En estos métodos se asume que los valores de LC50 o de la concentración a la cual no se observa el efecto (NOEC) para una sola especie y para todas las especies en una comunidad son variables estocásticamente independientes (seleccionadas al azar) con la misma distribución normal (Wagner, C., *et al.* 1991).

Una de las principales metas de la Ecotoxicología es producir datos que puedan usarse para predecir la respuesta probable a un estrés ambiental (Holloway, G., *et al.* 1997).

Otra aplicación de la Ecotoxicología es como herramienta en el seguimiento de los procesos de remediación y restauración de los sitios contaminados. Particularmente, la aceptación de la biorremediación como un tratamiento ambiental adecuado requiere la demostración de su eficacia, confiabilidad y predictibilidad. El diseño de un seguimiento efectivo incluye protocolos para el control y registro continuo tomando en cuenta el destino abiótico y biótico de los contaminantes.

Las baterías de ensayos ecotoxicológicos son variables, en dependencia de cada situación particular y de variados factores que se consideran. Un ejemplo de batería o secuencia de ensayos podría ser:

Efectos sobre las aves:

- Toxicidad oral aguda
- Toxicidad a corto plazo (8 días)
- Efectos sobre reproducción

Efectos sobre organismos acuáticos:

- Toxicidad aguda para peces
- Toxicidad crónica para peces
- Bioacumulación en peces
- Toxicidad aguda para microcrustáceos (*Daphnias*)
- Toxicidad crónica para microcrustáceos (*Daphnias*)
- Inhibición de crecimiento de microalgas.

Efectos sobre organismos distintos del objetivo:

- Toxicidad aguda para abejas
- Toxicidad aguda para artrópodos benéficos
- Toxicidad para lombrices de tierra
- Toxicidad para microorganismos de suelo.

2.5 Plaguicidas

Los plaguicidas sintéticos surgen entre 1930 y 1940 como resultado de investigaciones enfocadas al desarrollo de armas químicas que originalmente fueron probadas en insectos. Uno de los primeros compuestos, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) fue sintetizado por Zeidler en 1874, y sus propiedades insecticidas fueron descritas por Paul Müller hacia 1939. El DDT se utilizó por primera vez durante la segunda Guerra Mundial para proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por vector y se comercializó en los EE.UU. en 1945. La pujante industrialización, los intereses económicos de los

grandes productores de plaguicidas, así como la necesidad de controlar químicamente las plagas, favoreció su fabricación y consumo a escala mundial (OMS/OPS, 1993). Se originó, a su vez, una carrera incesante en la búsqueda de compuestos análogos menos tóxicos al ser humano y más efectivos y selectivos con las plagas. Sin embargo, al paso de algunos años se han hecho evidentes los efectos indeseables de los plaguicidas sobre la salud del ser humano y sobre el medio ambiente. Independientemente de sus beneficios, es evidente que los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad real (OMS/OPS, 1993). Afectan simultáneamente, y en mayor o menor grado, tanto a la «especie blanco» como a otras categorías de seres vivos, particularmente al ser humano (OMS/OPS, 1993; Briggs, 1992).

Actualmente, miles de productos se comercializan en todo el mundo, sin que sus efectos nocivos sean obstáculos que limiten su producción.

2.5.1 Definición

El Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Uso de Plaguicidas de la Food and Agriculture Organization (FAO) de las Naciones Unidas (FAO, 1986; Al-Saleh, 1994) establece que un plaguicida «es la sustancia o mezcla de ellas, destinada a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana o animal; las especies no deseadas de plantas o animales que ocasionan un daño duradero u otras que interfieren con la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; los artículos agrícolas de consumo, la madera y sus productos, el forraje para animales o los productos que pueden administrárseles para el control de insectos, arácnidos u otras plagas corporales. Por tanto, la finalidad de los plaguicidas es destruir ciertos organismos vivos, constituyéndose así como un grupo particular de los biosidas que puede alcanzar una capacidad letal amplia (Briggs, 1992).

En 1998, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los EE.UU. mantenía registrados 620 ingredientes activos la mayoría son sustancias orgánicas con las que se formulan aproximadamente 20.000 diferentes productos (Goldman, 1998). En la mezcla se asocian excipientes o diluyentes denominados ingredientes inertes (OMS/OPS, 1993; Moses, 1993), que constituyen una gran proporción del producto y cuyos efectos nocivos superan frecuentemente los del propio ingrediente activo; tal es el caso del tetracloruro de carbono y

el cloroformo, considerados potentes hepatotóxicos y neurotóxicos (Al-Saleh, 1994). Los plaguicidas comercializados también contienen impurezas, que son elementos químicos altamente tóxicos como las dioxinas de algunos herbicidas del tipo clorofenoxi, la etilentiourea en fungicidas del tipo etilenbisditiocarbamatos o el isomaltión en el malatión (Al-Saleh, 1994).

2.5.2 Clasificación

Los plaguicidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993). En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (López, 1993), definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (OMS/OPS, 1993) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad, expresada en DL50 (mg/kg)

| Clase | Toxicidad | Ejemplos |
|-----------|---------------------------|--------------------|
| Clase IA | Extremadamente peligrosos | Paratión, dieldrín |
| Clase IB | Altamente peligrosos | Eldrín, diclorvos |
| Clase II | Moderadamente peligrosos | DDT, clordano |
| Clase III | Ligeramente peligrosos | Malatión |

La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL50)* o de la concentración letal media (CL50). Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo, etc.), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, el sexo, etc. (López, 1993). Al basarse en la observación de especies animales, es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto (OMS/OPS, 1990). Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en

permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (OMS/OPS, 1990; Briggs, 1992; Al-Saleh, 1994) (tabla 2)

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad

| Persistencia ^a | Vida media ^b | Ejemplos |
|---------------------------|---------------------------|--|
| No persistente | De días hasta 12 semanas | Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín |
| Moderadamente persistente | De 1 a 18 meses | Paratión, lannate |
| Persistente | De varios meses a 20 años | DDT, aldrín, dieldrín |
| Permanentes | Indefinidamente | Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico |

a) Capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó.

b) Lapso de tiempo necesario para que se degrade la mitad del compuesto o mezcla aplicada.

De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los compuestos organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (López, 1993) (tabla 3). En este aspecto nos referiremos solamente a algunas familias de plaguicidas relevantes por el daño que causan a la salud y por su gran demanda de uso. Los organoclorados (OC) son los plaguicidas más ampliamente utilizados. Su estructura química corresponde a la de los hidrocarburos clorados (OMS/OPS.1990), lo que les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características favorecen su persistencia en el ambiente (OMS/OPS, 1990)¹ y su lenta biodegradabilidad (Al-Saleh, 1994). Su vida media es de 5 años, aunque varía según el producto; por ejemplo, para el beta hexaclorociclohexano es de 3 años, para el aldrín de 6 años y para el DDT es de 30

años (OMS/OPS, 1990). El compuesto como tal o sus metabolitos son contaminantes ubicuos de varios tejidos en humanos y de los mamíferos en general. A causa de su alta lipofilicidad tienden a acumularse principalmente en el tejido celular subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y de la sangre (Al-Saleh, 1994). Productos representativos de este grupo son el DDT, el aldrín, el dieldrín y el endrín, así como el endosulfán y el lindano, ambos todavía usados en España. Los compuestos organofosforados (OF), que son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosfortoico (OMS/OPS, 1993; Al-Saleh, 1994), forman otro grupo. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, tentativamente menos persistentes y poco acumulables en el organismo humano (OMS/OPS, 1993). Pertenecen a este grupo el paratión, el malatión, el diazinón, el clorpirifos y el diclorvos. Los carbamatos (C) son otro grupo de plaguicidas que pueden ser de tres tipos principales: a) derivados de ésteres carbamatados, comúnmente usados como insecticidas; b) derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas, y c) carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas (OMS/OPS, 1993; Al-Saleh, 1994).

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química

| Familia química | Ejemplos |
|-----------------------------------|--|
| Organoclorados | DDT, aldrín, endosulfán, endrín |
| Organofosforados | Bromophos, diclorvos, malatión |
| Carbamatos | Carbaryl, methomyl, propoxur |
| Tiocarbamatos | Ditiocarbamato, mancozeb, maneb |
| Piretroides | Cypermethrin, fenvalerato, permethrin |
| Derivados bipyridilos | Cloromequat, diquat, paraquat |
| Derivados del ácido fenoxiacético | Dicloroprop, picram, silvex |
| Derivados cloronitrofenólicos | DNOC, dinoterb, dinocap |
| Derivados de triazinas | Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine |
| Compuestos orgánicos del estaño | Cyhexatin, dowco, plictrán |
| Compuestos inorgánicos | Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco |
| Compuestos de origen botánico | Rotenona, nicotina, aceite de canola |

Todos ellos son relativamente inestables, se les atribuye un tiempo corto de persistencia ambiental y cuentan con cierta selectividad (OMS/OPS, 1993). Su degradación se realiza por oxidación y sus metabolitos finales son hidrosolubles pudiendo excretarse por la orina y las heces fecales (Al-Saleh, 1994). Entre los más comunes se encuentran el lannate, el carbarilo y el carbyl.

Las piretrinas (P) son plaguicidas obtenidos por secado, molienda y pulverización de la flor del crisantemo, cuyo polvo contiene del 1 al 3% del principio activo (Al-Saleh, 1994). Las principales piretrinas son las cinerinas I y II, las jasmolinas I y II, y las piretrinas I y II, consideradas estas últimas como las de efecto más potente. Tienen una relativa selectividad, por lo que su toxicidad es baja en organismos no blanco. Las moléculas de piretrinas son neuroactivas, de baja absorción dérmica, con un metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera (Al-Saleh, 1994). Los piretroides son piretrinas sintéticas que surgen en los años cincuenta y se consideran más efectivos que aquellas. Químicamente,

se dividen en dos tipos: a) sin grupo alfaciano, como el permetrín y resmetrín, y b) con grupo alfaciano, como fenvalerato, diametrín y cypermetrín. Todos son metabolizados por hidrólisis, oxidación y conjugación, con poca tendencia a acumularse en los tejidos. Además son rápidamente degradados en el ambiente, pues aunque se absorben masivamente por el suelo, se eliminan fácilmente con el agua (Al-Saleh, 1994).

2.5.3 Uso

El uso dado a los plaguicidas ha sido múltiple y variado, como se recoge en la tabla 4, lo que explica su ubicuidad (Moses, 1993). La agricultura es la actividad que más emplea este tipo de compuestos (Al-Saleh, 1994), consumiendo el 85% de la producción mundial (OMS/OPS, 1993; López, 1993), con el fin de controlar químicamente las diversas plagas que merman la cantidad y calidad de las cosechas de alimentos y de otros vegetales (OMS/OPS, 1993; Al-Saleh, 1994). Un 10% de la producción total de plaguicidas se utiliza en actividades de salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vector, como la malaria, la enfermedad de Chagas o el dengue, entre otras (OMS/OPS, 1993; López, 1993; Al-Saleh, 1994). Además, se usan para el control de roedores (Al-Saleh, 1994; Moses, 1993), en la potabilización del agua y en la erradicación de cultivos cuyos productos finales sean drogas ilícitas (Moses, 1993). Se usan también para el control de plagas en grandes estructuras como centros comerciales, edificios, aviones, trenes y barcos (Moses, 1993). Se aplican en áreas verdes ornamentales y de recreo como parques y jardines, para controlar la proliferación de insectos, hongos y el crecimiento de hierba y maleza. Con el mismo fin, se esparcen a lo largo de autopistas, vías férreas y torres con líneas de corriente de alta tensión (Moses, 1993). En reservas naturales o artificiales de agua los plaguicidas se emplean para prevenir el crecimiento de hierbas, algas, hongos y bacterias (Moses, 1993). En la industria se utilizan profusamente en la fabricación de equipos eléctricos, neveras, pinturas, tapices, papel, cartón y materiales para embalaje de alimentos, entre otros (Moses, 1993), para evitar en estos productos el desarrollo de bacterias, hongos, algas, levaduras o que sean dañados por plagas de insectos y/o roedores.

Tabla 4. Usos más frecuentes de los plaguicidas

| Actividad | Uso |
|--|--|
| Agricultura Salud pública | Control de las múltiples plagas que afectan las cosechas en cualquiera de sus etapas Control de vectores de enfermedades como malaria, dengue, enfermedad de Chagas, oncocercosis, peste, fiebre amarilla, filariasis, tripanosomiasis, esquistosomiasis, leishmaniasis y tifo Control de plagas (roedores) y erradicación de plantaciones cuyo producto final sea droga ilícita |
| Ganadería y cuidado de animales domésticos Tratamiento de estructuras | En la desinfección de ganado ovino y de animales domésticos como perros y gatos Tratamiento de edificios públicos y privados, oficinas, hospitales, hoteles, cines, teatros, restaurantes, escuelas, supermercados, tiendas de departamentos, instalaciones deportivas, bodegas de almacenamiento de alimentos y en la industria ferroviaria y de navegación marítima y aérea |
| Mantenimiento de áreas verdes | Tratamiento de parques, jardines, áreas de recreo, campos de golf y autopistas, vías férreas, andenes, torres con líneas de alta tensión y postes |
| Mantenimiento de reservas de agua | Tratamiento de grandes reservas de agua, naturales o artificiales, presas, embalses, diques, depósitos, estanques piscícolas, canales, albercas y piscinas |
| Industria | En la fabricación de neveras, equipos eléctricos, pinturas, resinas, pegamentos, pastas, ceras, líquidos limpiametales, tiendas de campaña, velas para navegación, redes para deporte, tapetes, alfombras y tapices, en la industria de la madera, materiales para embalaje de alimentos, cartón y múltiples productos de papel. En la industria de la alimentación, para la preservación de alimentos frescos como carnes, pescados, etc. |
| Hogar | Incorporados en productos como cosméticos, champús, jabones y repelentes de insectos. Se usan en el lavado y secado de alfombras, en desinfectantes caseros y en productos para el cuidado de mascotas y plantas, además del uso de insecticidas |

El hogar es un ámbito de especial interés: el 90% de los hogares de los EE.UU. usan plaguicidas y un 83% del total utilizado es aplicado dentro de la casa, el resto en áreas circundantes (OMS/OPS, 1990). Esta práctica generalizada en el mundo crece básicamente a partir del uso específico de insecticidas puesto que, de los 14 plaguicidas de mayor consumo, 12 son insecticidas. Por otra parte, es común el uso velado de los plaguicidas, ya que sin estar citados en la etiqueta reglamentaria del producto y sin advertir al consumidor sobre las precauciones de uso, son incorporados en productos como cosméticos y champús para preservarlos del desarrollo de hongos y bacterias, en repelentes de insectos y también en productos destinados al cuidado de mascotas y plantas para atacar o prevenir infestaciones por insectos (Moses, 1993).

2.5.4 Aspectos toxicológicos

Sin obviar la importancia de los plaguicidas, tanto en la agricultura como en las actividades de salud pública, son innegables los efectos tóxicos que generan en el ser humano (OMS/OPS, 1993). Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto

por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con las sustancias químicas (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.) (Fait, 1998), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (OMS/OPS, 1990; OMS/OPS, 1993; Fait, 1998). Las dietas bajas o carentes de proteínas y los estados de deshidratación son factores que influyen en la gravedad del daño a la salud. En animales de laboratorio sometidos a dietas hipoproteicas, las DL50 de algunos plaguicidas pueden disminuir entre 4 y 2.100 veces, situación que podría ser extrapolable al ser humano (OMS/OPS, 1993).

A este respecto, una gran proporción de la población laboral y general expuesta vive en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, donde el uso de plaguicidas es tan común como las carencias nutricionales mencionadas (OMS/OPS, 1993). La absorción depende de las propiedades de la fórmula y de la vía de entrada, que determinan que un producto cruce las barreras del cuerpo hasta alcanzar la sangre u otro tejido en particular. Las vías de entrada pueden ser varias y simultáneas, siendo las más comunes la vía dérmica, la digestiva y la respiratoria (Moses, 1993; Fait, 1998). Los plaguicidas penetran en la piel por difusión pasiva atravesando el estrato córneo. En el medio laboral la vía dérmica es la más importante, pues a través de ella y en función de la superficie de piel expuesta, se absorben cantidades significativas de diversos plaguicidas (Al-Saleh, 1994) que varían en su nivel de absorción.

El paso de OC a través de la piel cambia ampliamente según el tipo de sustancia; por ejemplo, el DDT es poco absorbido, pero otros como el endrín, el aldrín, el dieldrín y el heptacloro la penetran en mayor proporción y con mayor rapidez (OMS/OPS, 1990). Es posible encontrar en la dermis residuos de compuestos como el clordano o el paratión, incluso meses después de la última exposición (Moses, 1993). Ya absorbidos, los plaguicidas liposolubles se difunden a través de los componentes grasos de la piel y la sangre, mientras que los de moléculas hidrosolubles lo hacen a través del material proteico intracelular.

En la población general la vía de absorción más importante es el aparato digestivo a partir de la ingestión de alimentos y agua contaminados (Al-Saleh, 1994), ya mencionados en el apartado anterior. La ingestión deliberada o accidental es relativamente poco frecuente.

La fineza y delgadez del epitelio alveolar favorece el intercambio de gases en el pulmón; sin embargo, también permite una rápida y eficiente absorción de plaguicidas, que por vía aérea son captados rápidamente hacia el torrente sanguíneo. En el ámbito laboral el uso de fumigantes en forma de gases, polvos, vapores y nebulizaciones, coloca a la vía respiratoria como la segunda en importancia (Al-Saleh, 1994; Moses, 1993). En la población general la vía aérea es también otra importante ruta de absorción, la frecuente aplicación de plaguicidas en zonas de cultivo por vía aérea, su arrastre por el viento hacia zonas aledañas y el uso común en el hogar de productos en aerosol, nebulizaciones, bombas de humo, etc., favorecen la presencia del producto en el ambiente de forma continua y en pequeñas cantidades.

La circulación transplacentaria y la lactancia materna se consideran mecanismos de traspaso más que de absorción, pues muchos plaguicidas o sus metabolitos pasan directamente al nuevo ser a través de la barrera hematoplacentaria y/o durante el proceso de lactancia materna (OMS/OPS, 1990). Los plaguicidas se distribuyen en el organismo a través del torrente sanguíneo. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre (Fait, 1998). Según su afinidad, el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos, como el hígado o los riñones, y aquellos que son lipofílicos se acumularán en tejidos como el adiposo y el nervioso, tal es el caso del DDT (Fait, 1998) y, en general, los plaguicidas OC.

Hay dos tipos de reacciones por las que los plaguicidas se metabolizan en el organismo: las reacciones de primera fase (oxidación, reducción e hidrólisis), que generalmente son catalizadas por enzimas hepáticas, y las de segunda fase, que son la conjugación y la síntesis. Los metabolitos resultantes de la primera fase son ligados a moléculas endógenas, sintetizándose componentes solubles en agua y fácilmente eliminables por bilis y orina, como los metabolitos hidrosolubles de los piretroides (Fait, 1998). La biotransformación de los plaguicidas puede dar como resultado sustancias de reducida toxicidad o químicamente inactivas, como ocurre con el metabolito final del dimethoato. Por el contrario, pueden generarse sustancias tóxicamente más activas que el compuesto original, como es el caso del carbosulfán al transformarse en carbofurán, o del paratión que da origen al paraoxón, metabolitos con alta afinidad por el ADN y con capacidad mutágena importante (Fait, 1998).

El cuerpo humano elimina los plaguicidas por tres vías principales: la orina, las heces fecales y el aire exhalado. Algunos productos hidrosolubles, como el lindano y los herbicidas tipo fenoxi, son eliminados fácilmente por vía urinaria sin haber sufrido cambio alguno. La bilis es el medio principal por el que algunos compuestos liposolubles como el DDT y otros OC se eliminan en las heces fecales. Los fumigantes que llegan al cuerpo en forma de gases o vapores son eliminados comúnmente por vía respiratoria, tal es el caso del acrilonitrilo o del bromuro de metilo.

2.6 Bioplaguicidas

La agricultura por su propia naturaleza es antiecológica y en parte con el uso y abuso de agroquímicos (incluidos los antibióticos) dirigidos contra plagas y enfermedades, se han originado profundas modificaciones biológicas. Esto se ha adjudicado a la toxicidad y/o amplio espectro de estos productos lo que ha contribuido a una disminución de la biodiversidad y por tanto a una pobre regulación de las poblaciones macro y microbianas. Además, el interés creciente sobre la salud humana, que ha conllevado a fuertes restricciones sobre el uso de plaguicidas químicos, ha hecho necesario implementar estrategias más saludables, insertados en los sistemas de producción orgánica y sistemas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) donde el uso del control biológico, con los bioplaguicidas microbianos incluidos, viene a ofrecer una solución viable (Elósegui, 2006).

También conocidos como plaguicidas biológicos. Durante décadas, cuando era necesario controlar plagas y enfermedades se utilizaban plaguicidas químicos, son microbios subproductos de organismos vivientes, y sustancias de ocurrencia natural, incluyendo ciertas sales y jabones, para prevenir, repeler, eliminar o reducir los daños causados por la plagas. El manejo de resistencia, reducción en residuos de plaguicidas, salud y seguridad humana y responsabilidad ambiental han retado a los productores a considerar plaguicidas biológicos o bioplaguicidas, no sólo como alternativas a los plaguicidas químicos sino en rotación con éstos (Ecured, 2014).

En la actualidad se conocen más de 1500 especies de microorganismos entre hongos, bacterias y virus que son patógenos de artrópodos y controladores de otras poblaciones microbianas directamente. Sin embargo, solo unos pocos se usan rutinariamente en los programas de control de plagas (Elósegui, 2006).

Los productos bioplaguicidas representaron en el mercado el 2.5% del total de ventas de plaguicidas en el 2005, lo que representó 672 millones USD. Se espera que en el 2010 estos alcancen el 4.2% con un promedio de crecimiento de sus ventas de un 9.9% anual. Prevalcen los productos a base de microorganismos o metabolitos de estos directamente, que tienen las ventajas, en contraposición con muchos químicos, de una mayor seguridad al hombre, vertebrados e invertebrados y mayor especificidad por lo que su impacto es menor sobre la biodiversidad. Su baja residualidad y en general una menor probabilidad de desarrollo de resistencia por parte del organismo diana debido a su complejo modo de acción los hacen muy atractivos (Elósegui. 2006).

Sin embargo, los productos a base de hongos van tomando un lugar importante lo que es consecuencia del mecanismo de acción por ingestión donde la toxina (Delta endotoxina) se activa y se unen muy específicamente a receptores en las células peritróficas del intestino medio del organismo diana. También el uso de hongos antagonistas ha revolucionado el control de enfermedades de naturaleza fúngica en plantas, y se está investigando activamente en el efecto contra otros patógenos, debido a la capacidad de estos hongos de estimular el crecimiento de las plantas y activar los mecanismos de defensa locales y sistémicos, lo que hace posible su uso a una escala mucho más amplia. En este caso también se está investigando en el desarrollo de plantas transgénicas con la incorporación de genes de estos hongos para lograr resistencia de amplio espectro contra patógenos. Los antagonistas de naturaleza fúngica dominan alrededor del 90% del mercado para biocontrol de hongos fitopatógenos representados en gran extensión por *Trichoderma spp* (Elósegui. 2006).

Entre los microorganismos de naturaleza fúngica de más amplio uso contra especies de invertebrados plaga en la agricultura están los hifomicetos donde sobresalen *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii*, *Lecanicillium lecanii*, *L. longisporum* y *L. muscarium* (anteriormente *Verticillium lecanii*), *Pochonia chlamidosporia* (*V. chlamidosporium*), *Paecilomyces spp.* con *P. lilacinus* y *P. fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* y *Nomuraea rileyi*. Para el control de enfermedades fúngicas y también para nemátodos se encuentra *Trichoderma spp.* donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii*. Todos ellos presentan una estabilidad genética y fenotípica aceptable para el escalado en procesos de producción, son seguros al hombre y otras especies no diana del ecosistema y su rango de hospedante no es tan estrecho para hacerlos demasiado específicos en su uso.

Es en este último aspecto donde los virus fallan para controlar varias plagas pues son altamente especie-específicos conjuntamente con la necesidad de replicación in vivo (necesitan hospedantes para reproducirse). Sin embargo, su impacto en los agroecosistemas es muy bajo y son fáciles de registrar (Elósegui, 2006).

Los bioplaguicidas ofrecen seguridad alimentaria y están disponibles para plagas y enfermedades, tanto en raíces como en follaje. Pueden dividirse en dos grupos principales: bióticos (vivientes) y abióticos (no vivientes), y ambos se utilizan en importantes cultivos como tomate, chile, pimientos, cucurbitáceas, frutillas, bananas y tabaco entre otros. (Ecured, 2014)

Los bioplaguicidas obtenidos de hongos, insectos u otras plantas, están empezando a reemplazar los pesticidas químicos a manera de mantener los cultivos libres de insectos, sin costes ambientales significativos. (Ecoosfera, 2014)

Si bien los plaguicidas químicos son más baratos y son expertos en aniquilar millones de insectos en poco tiempo, los costes sanitarios y ambientales son muchos, además de que con el paso del tiempo las plagas han desarrollado una resistencia contra ellos, lo cual ha desembocado en una guerra tóxica en los campos.

Es por ello que poco a poco se ha ido apostando a los bioplaguicidas, aprovechando la armería que nos regala la naturaleza en las bacterias, hongos y plantas, y que nos permite reorientar estrategias para proteger los cultivos.

Particularmente, los hongos han demostrado ser verdaderos mercenarios agrícolas. Con el tratamiento adecuado, las esporas fúngicas pueden reducir ejércitos de insectos; billones de células llamadas “conidios” del hongo *Metarhizium anisopliae*, fueron pulverizadas en una solución con aceite mineral para debilitar las langostas que devoran los cultivos en África. Se estima que un 80% de los insectos fumigados muere en un lapso de una a tres semanas.

La mezcla resultó ser más que amable con otras especies, ya que otros animales resultaron ilesos. El hongo infectó solamente a las langostas hasta extinguirlas en los cultivos, situación que hubiese sido posible hasta una tercera o cuarta aplicación de cualquier pesticida químico.

Desgraciadamente, los costos de producción de estos bioplaguicidas aún no se han balanceado de tal forma que represente una opción en el mercado para los agricultores, por lo que un grupo de científicos del Departamento de Agricultura de los EEUU, se encuentra

experimentando con métodos de fermentación más baratas, utilizando materias primas menos costosas (pero igual de efectivas) como la harina de soja y la semilla de algodón.

2.6.1 Utilidades

En la actualidad se utilizan bioplaguicidas basados en hongos y bacterias. Sus múltiples modos de acción (MOA) permiten a estos microbios bloquear, ingerir o restringir el crecimiento y desarrollo de plagas y enfermedades. Debido a las numerosas maneras en que trabajan hongos y bacterias, es difícil que se desarrolle resistencia a lo largo de muchas generaciones. Determinadas especies de hongos del género *Trichoderma* pueden crecer sobre las raíces y tomar posesión de las enfermedades de pudrición de raíces (competencia de la rizosfera). Una cepa específica de *Trichoderma harzianum*, T-22, no sólo crece sobre las raíces sino que ataca la pudrición de las mismas por ingestión (micoparasitismo), reduciendo los problemas de pudrición de las raíces. (Ecured, 2014)

2.6.2 Las desventajas de los bioplaguicidas

Los bioplaguicidas son derivados de materiales orgánicos y biológicos naturales. Estos productos tienen tres categorías: microbiana; la cual se deriva de bacterias y virus, los protectores incorporados en la planta; los cuales están hechos de los pesticidas producidos naturalmente por las plantas, y las no tóxicas; las sustancias de origen natural. Muchos creen que este tipo de productos son una alternativa ecológica a los pesticidas convencionales, ya que son menos tóxicos e interrumpen el ciclo de vida de las plagas sin afectar el medio ambiente que les rodea. Sin embargo, existen varias desventajas potenciales presentadas por el uso de bioplaguicidas. (Hanson, 2014)

En general, entre las desventajas de los bioplaguicidas sobresalen un control menos rápido, requisitos de aplicación muchas veces engorrosos para el productor ordinario y una marcada sensibilidad a la baja humedad relativa, las altas temperaturas y la radiación UV lo que hace que la mayor parte de los programas contra plagas aún sitúen al biocontrol (y específicamente al control microbiano) en el último peldaño después que han fracasado otras opciones, lo que limita fuertemente el nivel de conocimiento que se puede adquirir a través de su uso (Elósegui, 2006).

Otras desventajas son: (Hanson, 2014)

Alta especificidad

Uno de los beneficios de un bioplaguicida es que mata sólo las plagas de las cuales está químicamente diseñado para afectar, dejando que otras plantas y animales queden sanos y salvos. Sin embargo, la mayor fortaleza de un bioplaguicida es también su mayor debilidad. Si cualquier plaga distinta a la cual están destinados invade, serán inmunes. Esto significa que pueden ser necesarios varios tipos de bioplaguicidas para disuadir a las plagas.

Costoso

El bioplaguicida es más costoso y menos disponible que los pesticidas convencionales. Esto puede significar más dinero y tiempo invertido en obtenerlo. Aunque esto puede ser aceptable para el jardinero ocasional, para los agricultores con grandes cultivos puede ser difícil el uso constante.

Menos potente

El bioplaguicida es menos tóxico y por lo tanto, inevitablemente menos potente, que los pesticidas convencionales. Una gran cantidad de bioplaguicidas puede tener los mismos efectos que significativamente cantidades menores de plaguicida regular. Esto se suma a los ya altos costos del uso de este tipo de productos.

Reaplicación frecuente

En general, los bioplaguicidas tienen una vida útil más corta que los pesticidas regulares. Mientras que un pesticida regular puede durar semanas o meses, los bioplaguicidas necesitan volverse a aplicar más frecuente. Esto puede ser una molestia, sin dejar de mencionar que son una fuga de dinero.

2.6.3 Control biológico: el uso de bioplaguicidas (Palmas del Espino, 2011)

Desde hace más de 15 años, Palmas del Espino viene impulsando la investigación y desarrollo de alternativas biológicas para el control de plagas y enfermedades en el cultivo de Palma Aceitera. Una tarea con grandes satisfacciones, no solo en el ámbito agrícola, sino también en el humano y ambiental.

Una de estas alternativas biológicas es el uso de bioplaguicidas. Pero, ¿qué es un bioplaguicida? Como su nombre lo indica bio= vida y plaguicida=que destruye plagas, es decir: “vida que destruye plagas”.

La principal característica de un plaguicida biológico es que su ingrediente activo no es químico sino un organismo microscópico vivo que ocasiona la muerte de un insecto u otro organismo que esté afectando al cultivo. Se diferencia de los plaguicidas químicos porque es específico, en otras palabras, sólo ataca a la plaga que se desea controlar, no presenta residualidad, no son dañinos para los humanos y no afecta la fauna nativa de los ecosistemas donde se usan.

Su modo de acción es diferente, son más lentos en el control y se deben tener ciertas consideraciones para su aplicación. Sin embargo su eficiencia es muy similar a la de los plaguicidas químicos.

Actualmente en el Centro de Producción de Bioplaguicidas (CPB), se multiplican virus y hongos nativos, con efectividad demostrada en campo de hasta 75-80% de control. Se está investigando la posibilidad de producir una bacteria cuyos resultados preliminares de control llegan a 50% en condiciones de campo. Igualmente se está buscando nuevas formas de multiplicar virus bajo condiciones de laboratorio para tener mayores volúmenes de producción.

Los bioplaguicidas tienen un potencial muy grande hacia futuro, y frente a ello el área de Sanidad Vegetal de Palmas del Espino y Palmas del Shanusi, con el apoyo de nuestra Gerencia General y Gerencia Central Agrícola, lo vienen desarrollando en forma gradual, responsable y de manera satisfactoria.

2.6.4 Registro de bioplaguicidas microbianos (Elósegui, 2006).

Los productos a base de microorganismos o metabolitos obtenidos para el biocontrol deben ser seguros, virulentos a las especies diana, libres de patógenos humanos y de calidad consistente y reproducible.

Los hongos usados en el biocontrol de plagas agrícolas afortunadamente pueden ser propagados masivamente sin la intervención directa de un hospedante vivo, lo que evita contaminaciones bacterianas adicionales, el mantener crías de insectos u otro hospedante sanitariamente adecuadas, laboratorio. Estos aspectos facilitan su registro.

No obstante, en el mundo existe una marcada diferencia entre países desarrollados y en desarrollo en cuanto a los requisitos para registrar un producto. De esta forma en muchos países en desarrollo la industria de productos biocontroladores de plagas no está regulada o muy pocas exigencias existen al respecto lo que hace que salgan al mercado productos de pobre calidad. Esto se debe a que las pruebas de calidad incluyen mayores gastos de capital y de mano de obra calificada y al desconocimiento y/o ausencia parcial o completa de protocolos de calidad con amplia aceptación internacional. De hecho, no se cuenta con normas internacionales de calidad aprobadas. Todo esto puede desacreditar el prestigio de los bioproductos por parte de los productores y endentece la adopción de los nuevos métodos de trabajo con bioplaguicidas.

En países donde se exige una rigurosa información del producto que se quiere registrar las autoridades reguladoras (en países desarrollados y en desarrollo que son muy exigentes a la hora de registrar un producto) demandan pruebas poco realistas por desconocimiento sobre estos productos, a los que muchas veces tratan de aplicarle los mismos requerimientos que a las moléculas sintéticas químicas. Otras veces exigen pruebas económicamente inaceptables.

En los últimos años han surgido grupos de trabajo fuertes donde se han asociado importantes productores de biológicos, instituciones de investigación prestigiosas y organismos reguladores para lograr una mejor armonización y resolución más efectiva de estos problemas.

Hoy día se cuentan con instituciones líderes que tienen establecidos protocolos para control de calidad y toxicidad e impacto ambiental de estos bioproductos. Se trabaja arduamente para lograr establecer estas pruebas en los laboratorios que se dedican a estas producciones. Una vez que se logre un acuerdo general el siguiente paso será la implementación de sistemas de acreditación externos (tales como ISO 9000, Buenas Prácticas de Producción [BPP ó GMP], los que corroborarán la calidad de los productos y su inocuidad en los países desarrollados. En los subdesarrollados, los protocolos y entrenamientos se pueden ofertar a través de organismos de cooperación internacional especializados como el IBCD (International Biopesticide Consortium for Development) o el IBMA (International Biocontrol Manufacturers Association).

Sin embargo, en los últimos 5 años la industria de bioplaguicidas se ha fortalecido con productos de más calidad conjuntamente con la prohibición en muchos países,

especialmente desarrollados, de moléculas químicas plaguicidas y la certificación de sistemas orgánicos donde se contempla el uso de productos bioplaguicidas.

Por ejemplo, la EPA (Environmental Protection Agency of USA) obtiene la información de una Oficina adjunta (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, United States Environmental Protection Agency) que se dedica a la evaluación de pruebas de plaguicidas y sustancias tóxicas, las que se envían a la EPA para su revisión bajo las regulaciones federales. En general se exigen estudios que identifiquen a nivel molecular el aislado, estudios toxicológicos (teratogénicos, toxicidad crónica, subcrónica y aguda) incluyendo genotoxicológicos o carcinogénicos en dependencia del producto. A continuación se listan requerimientos exigidos en los países líderes en biocontrol desarrollados y en algunos en desarrollo como Cuba.

Para el registro del producto se necesitan conocer los siguientes datos:

Nombre genérico (científico), tipo de plaguicida (insecticida, fungicida biológico, etc.), datos completos del grupo que lo produce, usos y formulaciones (plaga que controlará, tipos de cultivo, tipos de formulaciones (polvos humedecibles, concentrados líquidos), métodos de aplicación (preparado disuelto en agua con adyuvantes, equipos de aplicación, cantidad que se aplica, etc.), literatura científica que apoye seguridad de uso, estudios de patogenicidad en especies no diana, baterías de ensayos con animales de laboratorio que incluyan mamíferos por diferentes vías: oral, inhalación, tópica, intravenoso, etc). Algunos estudios se pueden evadir por el análisis de vías de exposición más probables a que se expone el productor del biocontrol o el usuario final producto además de un estudio médico riguroso de voluntarios expuestos a este. Determinar los pasos críticos del proceso productivo para evaluar posible contaminación microbiana y cuando esta ocurra asegurar que en ningún lote hay patógenos humanos ni a animales. Estudios ecotoxicológicos (seguros a peces, aves, reptiles, abejas, otras especies de plantas, etc.), algunos de los cuales no se aplican según el uso al que va dirigido el producto. Destino del producto en el ambiente (por ejemplo si contamina estuarios, ríos, etc). Características físicas y químicas (pH, densidad, color, olor). Además de las pruebas de calidad biológicas (Elósegui, 2006).

2.6.5 Elementos de bioseguridad en la producción de bioplaguicidas. Buenas Prácticas de producción y diseño de instalaciones (Elósegui, 2006).

2.6.5.1 Grupos de riesgos y particularidades

La exposición al riesgo biológico puede ser directa o indirecta. No todos los trabajos con microorganismos tienen igual nivel de riesgo, ya que éste depende de la peligrosidad del agente para las personas y el ambiente. La clasificación de agentes biológicos en grupos de riesgo se realiza considerando varios criterios:

- 1.- Capacidad del microorganismo para producir daño.
- 2.- Modo de transmisión o diseminación.
- 3.- Gama de hospedantes del microorganismo.
- 4.- Disponibilidad de tratamiento eficaz.
- 5.- Disponibilidad de medidas eficaces para eliminar riesgo en la comunidad y el ambiente.
- 6.- Concentración y volumen que se trabaja.

Atendiendo a lo anterior se establecen cuatro grupos de riesgo para microorganismos potencialmente patógenos al hombre, a los animales y al ambiente. Los de biocontrol están agrupados en los grupos de riesgo más bajos que son el grupo 1 y el grupo 2 de 4 grupos que existen en total.

Grupo 1.- Escaso riesgo, pocas probabilidades de ser patógenos al hombre y animales. Por ejemplo: microorganismos de la industria láctea, de vinos, para producción de antibióticos, así como los que se emplean en el control biológico de forma general.

Grupo 2.- Riesgo individual moderado y bajo para la comunidad. Pueden provocar enfermedades en el hombre y animales. Pocas probabilidades de afectar al personal del laboratorio y al medio ambiente. Cuando ocurre la exposición el laboratorio puede provocar infección grave, pero existen medidas para eliminarlo y la propagación a la comunidad es limitada.

En el trabajo con microorganismos deben realizarse análisis de riesgo

Los análisis de riesgo tienen dos etapas:

- 1.- Estimación del riesgo
- 2.- Manejo del riesgo.

- 1.- La estimación del riesgo interpreta y evalúa la información, e identifica el posible peligro y las consecuencias asociadas.
- 2.- El manejo del riesgo determina la política de mercado para decidir cómo eliminar el riesgo estimado.

Por otra parte, la percepción pública del riesgo y los beneficios de una tecnología influyen en la regulación, por lo que los alcances del riesgo y sus regulaciones se deciden frecuentemente considerando la percepción pública en relación con las bases científicas correspondientes. El análisis de riesgo, teniendo en cuenta solo los aspectos científicos, probablemente no son del todo acertados, de ahí que los criterios de la opinión pública pueden ser muy importantes.

Los riesgos principales de los bioplaguicidas son:

- 1.- Patogenicidad sobre organismos no diana (blanco).
- 2.- Toxicidad.
- 3.- Competitividad por espacio con otros microorganismos.
- 4.- Alergia.

Las pruebas de seguridad deben estar dirigidas a:

- Seguridad sobre vertebrados mediante pruebas toxicológicas de laboratorio.
- Efecto sobre invertebrados mediante bioensayos.

Para evitar el escape de los microorganismos se han desarrollado una serie de procedimientos, mecanismos y adecuaciones físicas que se conocen con el término de contención.

2.7 *Trichoderma*

El género *Trichoderma* está integrado por un gran número de cepas fúngicas que actúan como agentes de control biológico y cuyas propiedades antagónicas se basan en la activación de mecanismos muy diversos (Benítez *et al.*, 2004). En un hongo natural del suelo presentándose principalmente en los de uso agrícola o de materiales vegetales en estado de descomposición y tiene la capacidad de adaptarse a varios ambientes (Druzhinina, 2005).

No se conocen efectos nocivos de *Trichoderma* sobre otros microorganismos benéficos o sobre la propia planta. Puede provocar reacciones alérgicas en humanos, sin negativas

consecuencias socioeconómicas y sanitarias. Aunque se han reportado efectos tóxicos de algunas cepas como por ejemplo (Solfrizzo *et al.*, 1994), refiere que en el estudio de 15 cepas de *Trichoderma* pertenecientes a 12 diferentes especies de uso potencial en el control biológico examinadas para determinar su capacidad para producir antibióticos polipéptidos (peptaiboles) encontraron que en extractos de cultivo de 6 cepas de *Trichoderma* ensayadas fueron extremadamente tóxicos para las larvas de *Artemia salina*; y que para 5 de ellos esta toxicidad podría atribuirse a paracelsin (calculado LD50 = 2,2 microM).

Algunos autores (Peltola *et al.*, 2004), encontraron que el extracto celular crudo metanólico de *Trichoderma harzianum* cepa ES39 inhibe la motilidad celular en espermatozoides de cerdo a una concentración y baja exposición (concentración efectiva 50%, 1 a 5 microg [peso seco] x ml de semen porcino extendida. La misma concentración de exposición agotó el NADH en los espermatozoides de verraco. La inspección de espermatozoides de jabalíes expuestos y analizados por microscopía electrónica de transmisión reveló daños en la membrana plasmática. Por otra parte (Eduard, 2009) plantea que en los estudios epidemiológicos de poblaciones altamente expuestas se produce disminución de la función pulmonar, síntomas respiratorios y la inflamación de las vías comenzaron a aparecer en los niveles de exposición de 105 esporas/m³ y que el desafío humano y estudios epidemiológicos apoyan LOEL bastante consistentes de aproximadamente 105 esporas/m³ para las especies de hongos en diversas poblaciones no sensibles.

Las especies de *Trichoderma* producen o secretan una variedad de compuestos que inducen respuestas de resistencia localizadas y sistémicas en plantas. Varias cepas de *Trichoderma* tienen un largo reconocimiento como agentes biológicos, para el control de enfermedades de las plantas y por la habilidad de incrementar el crecimiento y desarrollo de las raíces, productividad de las cosechas y resistencias al estrés biótico y captación y uso de nutriente (Ranasingh *et al.*, 2006).

Es un hongo filamentoso, anamórfico (fase asexual), heterótrofo; pared celular compuesta de quitina, de rápido crecimiento que puede utilizar una gran variedad de sustratos complejos como fuentes de carbono. Son saprófitos de la madera y del suelo, donde su crecimiento es muy rápido (Monte, 2001; Martínez, 2007; Reino *et al.*, 2008).

La mayoría de las especies de este género son fotosensibles, presentan mayor esporulación al ser expuestas a la luz. Se desarrollan a un rango de pH relativamente amplio, comprendido entre valores de 2.0 y 9.0, con un pH óptimo que se encuentra entre 4.0 y 7.0

(Domsch *et al.*, 1980). Muchas cepas crecen eficientemente en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperatura, además son relativamente tolerantes a humedades bajas y tienden a crecer en suelos ácidos (Lorito, 2006).

Para el control de enfermedades fúngicas y también para nemátodos se encuentran especies del género *Trichoderma spp.*, donde sobresalen *T. harzianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. pseudokoningii*, pero solo hasta hace poco tiempo estas cepas han comenzado a adquirir un valor comercial.

Actúa sobre un grupo de especies fitopatógenas de los géneros *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Gaeumannomyces graminis var Trici* bajo condiciones de invernadero y en el campo (Stefanova *et al.*, 1999 ; Küçük , 2003; Elósegui, 2006; Stefanova, 2007).

La cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* es capaz de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos por su velocidad de crecimiento y su elevada capacidad hiperparasítica, por su capacidad de producir antibióticos y otras sustancias líticas, además es un colonizador por excelencia compitiendo por espacio y nutrientes (Fernández-Larrea, 2001; Ezziyyani *et al.*, 2004; Lorito, 2006). Producen antibióticos y toxinas de naturaleza volátil o no volátil (Benítez *et al.*, 2004; Ranasingh *et al.*, 2006; Reino *et al.*, 2008) en el cual se destaca el papel de celulasas, y glucanasas (Pérez *et al.*, 2002; Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Fernández-Larrea, 2006).

La dominancia de *Trichoderma* sobre el patógeno es alcanzada por la biosíntesis de un amplio rango de metabolitos secundarios mediante la utilización de compuestos naturales y xenobióticos, produciendo además una variedad de enzimas degradativas como quitinasas y celulasas que le permiten metabolizar una amplia gama de compuestos (Reino *et al.*, 2008). Sus esporas se mantienen latentes bajo condiciones favorables en los suelos, especialmente si son ricos en materia orgánica.

Trichoderma spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios a partir de las cuales se desarrolla el micelio mediante la germinación de los propágulos. Su desarrollo es vegetativo, en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación.

2.7.1 *Trichoderma harzianum* (Ecured, 2014)

Hongo antagonista de patógenos vegetales, se encuentra presente en la mayoría de los suelos. Su crecimiento se ve favorecido por la presencia de raíces de plantas, a las cuales coloniza rápidamente. Se clasifica en grupos de hongos hipógeos, lignolícolas y depredadores.

2.7.2 Hábitat

Se encuentra en suelos abundantes en materia orgánica, es aeróbico y puede estar en los suelos con pH neutro hasta ácido.

2.7.3 Características

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es raro en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal.

Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especie. Son haploides y su pared está compuesta por quitinas y glucanos. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales.

2.7.4 Morfología

Es un hongo que posee estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidioforo hialino largo no verticilado, nace en centros pequeños. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estructuras de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. Es saprofito del suelo y de la madera y el crecimiento en el suelo es muy rápido. Tiene excelentes propiedades para el control biológico, siendo especialmente efectiva contra *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*. A su vez, es un excelente estimulador del crecimiento radicular.

2.7.5 Aplicaciones

Se aplica comercialmente en la producción de enzimas y para la regulación de los fitopatógenos que enferman las plantas. Además cuando se aplica *Trichoderma* en campo

se deben tener en cuenta varios aspectos importantes que permitan su adecuada expresión, que se relacionan con la interacción planta hospedante – fitopatógeno susceptible – ambiente favorable (Temperatura del suelo, humedad, presencia de oxígeno, pH), Condiciones del suelo (estructura, contenido de materia orgánica y nutrientes) y tiempo.

2.7.6 Modo de acción

Está asociado a la descomposición de la materia orgánica que hay en el suelo y por el antagonismo con microorganismos patógenos a las plantas usando procesos de amensalismo, depredación, parasitismo y competición, y por su Hiperparasitismo.

2.7.7 Ventajas de su aplicación

- Protege las raíces de enfermedades causadas por *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* y permite el crecimiento de raíces más fuertes y por lo tanto, sistemas radiculares más sanos.
- Aumenta la capacidad de captura de nutrientes y de humedad, así como mejora rendimientos en condiciones de estrés hídrico.
- No requiere equipamiento especial para su aplicación.
- Compatible con inoculantes de leguminosas y posibilidad de aplicar a semillas que han sufrido un tratamiento fungicida químico.
- Disminuyen y en algunos casos eliminan la necesidad de tratar con fungicidas químicos, reduciendo los costes y reduciendo el uso de fertilizantes, pues las plantas tienen más raíces y los utilizan mejor.

3. Materiales y métodos

Identificación de la sustancia de ensayo y del vehículo

La sustancia de ensayo evaluada fue el bioplaguicida Tricosave-34.

El biopreparado consistió en una mezcla sólida granulada compuesta por sustrato inerte a base de residuos de arroz (punta y cáscara) y conidios de la Cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* Rifai perteneciente a la colección del Instituto de Sanidad Vegetal. La muestra recibida estaba acompañada de un certificado de calidad con los siguientes datos:

Procedencia de la sustancia de ensayo: Sucursal Sancti Spíritus LABIOFAM S.A

3.1 Vehículo

Se utilizó agua destilada con un pH ajustado 7 para suspender el la sustancia de ensayo.

3.2 Preparación de la sustancia de ensayo

Antes de la preparación de las muestras para ensayos toxicológicos y ecotoxicológicos se procedió a la comprobación de la concentración de conidios en el sustrato colonizado (cáscara de arroz) por medio de conteo en hematocitómetro según el siguiente procedimiento:

- Se pesó 1 g del producto y se suspendió en 250 ml de agua destilada estéril con ayuda del tensoactivo Tween 80 al 0.05 %. Se mantuvo en agitación magnética vigorosa por 5 min para desprender los conidios y homogenizar la suspensión.
- Se tomó una alícuota para conteo en cámara de Neubauer considerándose válido el conteo si el número de conidios estaba entre 30 y 300 por cámara (de no ser así se diluyó o concentró según sea el caso). El título se obtuvo de la multiplicación del conteo por 10000 y el factor de dilución.

Para ajustar la concentración de conidios sobre la base de ese título se hicieron diluciones seriadas con agua destilada para alcanzar las concentraciones de ensayo.

3.3 Ensayos ecotoxicológicos

3.3.1 Ensayo de germinación y elongación de la raíz en lechuga (*Lactuca sativa*)

3.3.1.1 Métodos

Se evaluó el efecto fitotóxico sobre semillas de *Lactuca sativa* L. luego de una exposición aguda a varias concentraciones del Tricosave-34 en condiciones controladas. Se contabilizaron las semillas germinadas y se midió la elongación radicular considerando que estaban germinadas cuando la raíz principal alcanzaba 5 mm tomando la distancia desde el hipocotilo hasta el extremo distal de la raíz. Se estimaron las medias, las curvas concentración-efecto y se calculó la CI50 para la germinación y la CI50 para la inhibición de la elongación de la raíces.

El ensayo se realizó acorde a procedimientos establecidos para este tipo de estudio en el Centro de Bioactivos Químicos sobre la base de metodologías de la (EPA, 1996).

3.3.1.2 Fundamentación del biomodelo empleado

La factibilidad de la utilización de las plantas como biomodelo está fundamentada principalmente en las ventajas que ofrece desde el punto de vista experimental pues son de fácil manipulación y almacenaje, son modelos con bajo costo de mantenimiento, poseen mecanismos enzimáticos similares a los sistemas de animales y presentan una buena correlación con otros sistemas de ensayos. Son útiles para la evaluación de muestras ambientales, biomonitoreo de aguas residuales y para evaluar la seguridad de productos nuevos de origen natural o sintético para su uso en la agricultura en el combate de plagas y enfermedades.

Las semillas de lechuga son de gran sensibilidad para evaluar efectos tóxicos en estadios tempranos de desarrollo vegetal y son de las especies de plantas terrestres no diana comerciales incluidas en varias guías regulatorias incluyendo las de la EPA.

3.3.1.3 Sistema de ensayo

Se utilizó como biomodelo semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga) proveniente de la Empresa Provincial de Semillas Varias de Villa Clara, certificadas por el Laboratorio de Sanidad Vegetal de Villa Clara con viabilidad probada mayor del 95% y libre de plaguicidas.

Las semillas se agruparon por tamaño y morfología y se escogieron el grupo más uniforme para el ensayo definitivo.

El bioensayo con semillas de lechuga es un ensayo estático de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se evaluaron los efectos fitotóxicos de la sustancia de ensayo en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días del crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determinó la CI_{50} de la germinación (considerada como efecto letal) y la CI_{50} de la elongación de la raíz (considerado como un efecto subletal).

3.3.1.4 Condiciones de mantenimiento

A las semillas que se utilizaron se les realizó la recepción, inspección y comprobación de % de germinación. Después de este proceder fueron guardados en frascos tapados en refrigeración (15 ± 2 °C) hasta su utilización en el ensayo.

3.3.1.5 Distribución y formación de grupos experimentales

Se conformaron 5 grupos experimentales: 4 se correspondieron con tratamientos con suspensiones de Tricosave-34 a concentraciones de 10^{11} , 10^{10} , 10^9 , y 10^8 conidios por mL; y un grupo control negativo tratado con agua destilada. Cada concentración se replicó tres veces. Se asignaron 20 semillas por placa (60 por concentración)

Las placas fueron identificadas utilizando marcador permanente teniendo en cuenta la concentración y el número de la réplica.

3.3.1.6 Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

Las semillas se ubicaron de forma equidistante en la placa sobre un soporte inerte, papel de filtro, al que se le añadieron 4 ml de la suspensión de ensayo.

Las semillas permanecieron en contacto directo con la sustancia de ensayo durante cinco días en total oscuridad en un local con temperatura controlada de 25 ± 1 °C.

Al culminar el período se observó y registraron las semillas germinadas y se determinó el largo de las raíces de las semillas germinadas.

3.3.1.7 Estudio anatomopatológico

Se tomaron muestras de las semillas no germinadas y se les realizó un estudio macroscópico y se procesaron para análisis histopatológico de rutina con tinción hematoxilina eosina.

3.3.1.8 Análisis estadístico

Se recogieron los datos de las variables informativa, temperatura, y de las de control (germinación y tamaño de la raíz). La estimación de la CI_{50} de inhibición de la germinación y de elongación de la raíz se realizó mediante un ajuste a una curva sigmoide utilizando el paquete estadístico Statistica 10. Se determinó la CI_{50} (Inhibición de la germinación se considera como un efecto letal) y la IC_{50} (Inhibición de la elongación de la raíz se considera como un efecto subletal).

3.3.2 Ensayo en lombriz terrestre (*Eisenia foetida*)

3.3.2.1 Métodos

Se evaluó el efecto tóxico de la exposición aguda del biopreparado, a una concentración 10 veces la prevista para su uso, sobre la lombriz *Eisenia foetida*, en condiciones controladas sobre papel filtro húmedo. Los parámetros finales que se evaluaron fueron mortalidad y eventos clínicos subletales.

Este ensayo estático de toxicidad aguda evalúa los efectos tóxicos de una exposición por contacto durante 48 h, extensible a 72 h si fuera necesario. Esta prueba se utiliza como preliminar para determinar las concentraciones a las que se tiene que llevar a cabo la prueba con suelo.

El ensayo se basó en lo descrito en la guía 207 de la OECD para la evaluación de sustancias, Ensayo de toxicidad aguda en lombrices de tierra (OECD, 1984).

Los ensayos fueron conducidos en concordancia con los Principios de Buenas Prácticas de laboratorio No Clínico (MINSAP, 2004), y la Guía para el cuidado, y uso de los animales para experimentación (CENPALAB, 2000).

3.3.2.2 Fundamentación del biomodelo empleado

Las lombrices son ampliamente reconocidas como biomodelo para evaluar la toxicidad de suelos contaminados, este organismo es un componente abundante y de gran valor dentro

de los ecosistemas terrestres por lo que es considerado un bioindicador “in situ” o centinela de posibles daños al ecosistema. Tiene fácil recolección, manipulación y mantenimiento en una variedad de residuos orgánicos. La especie recomendada es *Eisenia foetida* que aunque no es una típica lombriz de tierra se encuentra en suelos ricos en materia orgánica con una susceptibilidad a productos químicos similar a la de especies que habitan en el suelo. Es prolífica, y tiene un ciclo de vida corto (8 semanas para alcanzar la madurez).

3.3.2.3 Sistema de ensayo

Se emplearon lombrices adultas cliteladas (de más de 2 meses de edad) de la especie *Eisenia foetida* con un peso promedio entre los 300 a 450 mg procedentes de la Unidad de Desarrollo de Estudios Pre-clínicos (UDEP) perteneciente al Centro de Bioactivos Químicos. Las lombrices incluidas en el ensayo se seleccionaron en función del peso, longitud y morfología para lograr homogeneidad en el biomodelo.

Las lombrices se mantuvieron en un vial, en contacto con un papel humedecido con la suspensión de Tricosave-34 a una concentración única, en condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y en oscuridad. Antes de ser colocadas en los viales, las lombrices se depositaron por tres horas en papel de filtro humedecido con la finalidad de vaciar sus intestinos; después fueron lavadas y secadas.

El ensayo se extendió por 48 horas. Las lombrices se consideraron muertas cuando no respondieron a ningún estímulo mecánico. Cualquier otro síntoma patológico se registró. La prueba se consideró válida pues no se presentó ninguna mortalidad en el control.

3.3.2.4 Condiciones de mantenimiento y alimentación

El ensayo se realizó en un ambiente controlado con temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y sin iluminación. Las lombrices no recibieron alimento durante el ensayo.

3.3.2.5 Distribución y formación de grupos experimentales

Para desarrollar el ensayo se formaron dos grupos experimentales:

Grupo1 (control): estuvo conformado por 10 individuos los cuales fueron dispuestos en viales individuales que solo recibieron agente humectante, en este caso fue agua destilada.

Grupo2 (tratado): estuvo conformado por 30 individuos (10 por réplica) y recibieron el tratamiento de 10^8 conidios/mL.

La asignación a los grupos experimentales fue al azar.

3.3.2.6 Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

La vía de administración que se empleó para este ensayo fue la tópica o por contacto directo con el cuerpo de la lombriz, la concentración que se utilizó fue de 108 conidios/ml, con una frecuencia única y una duración de 48 horas.

La muestra se resuspendió en agua, se depositó 1 mL de esta suspensión en el papel filtro (con micropipeta) que estaba dentro del vial (ya identificado), cuidando que se distribuyera homogéneamente por rotación del frasco. Se secó el papel de filtro dentro del frasco destapado en una campana de extracción de gases.

Una vez seco el papel se le adicionó agua destilada en un volumen acorde a los resultados de la prueba límite de humedad explicada previamente, que en este estudio fue 1 ml, y se depositó una lombriz lavada y secada por cada vial, el que se tapó con un tapón perforado para permitir preservar la humedad y facilitar el intercambio de aire.

3.3.2.7 Observaciones clínicas

Se hicieron observaciones a las 24, y 48 h en ambos grupos, registrándose los signos clínicos subletales de respuesta como: cambios en la respuesta al estímulo mecánico, consistencia blanduzca del cuerpo de la lombriz, pérdida de fluido celómico, daños apreciables en la región clitelal, presencia de abultamientos y constricciones en diferentes regiones del cuerpo.

3.3.2.8 Eutanasia

La eutanasia se ejecutó mediante un método aceptado, por congelamiento, y se trató de provocar el mínimo de sufrimiento a los animales durante el experimento.

3.3.2.9 Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de mortalidad para ambos grupos (Control y Tratado). En vista de no obtenerse mortalidad para todos los grupos, no procedieron otros análisis.

Se determinó el porcentaje de mortalidad para ambos grupos (Control y Tratado). De ser posible se realizó el test de la T de Student y el test de la U de Mann-Whitney para la comparación con un nivel de significación de $p < 0.05$.

En caso de usar varias concentraciones se obtendría una curva dosis efecto y se estimaría la concentración letal 50 (CL₅₀) mediante un ajuste a una curva sigmoidea utilizando el paquete estadístico "Statistica"

3.3.3 Ensayo en moluscos (*Physa cubensis*)

3.3.3.1 Métodos

La prueba consistió en la determinación de efectos tóxicos (inmovilización o mortalidad), observados en un tiempo de exposición de 96 horas, en juveniles del molusco dulceacuícola *Physa cubensis*.

Durante este ensayo se expuso el biopreparado de ensayo a una concentración de máximo riesgo, 10^9 conidios/mL. Se evaluó la mortalidad cada 24 horas y hasta el término del bioensayo (96 horas), haciendo anotaciones sobre el número de organismos con eventos clínicos subletales.

El estudio se desarrolló teniendo en cuenta lo establecido por la entidad reguladora Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (US-EPA, 1996 e,f,g)

3.3.3.2 Fundamentación del biomodelo empleado

La relevancia del empleo de moluscos dulceacuícolas como organismos de prueba radica en su ubicación en un ecosistema de vulnerabilidad a la contaminación y a su función trófica de importancia en la dinámica de los ecosistemas acuícolas y terrestres. La especie seleccionada se caracteriza por su pequeño tamaño, rápido desarrollo, alta fecundidad, fácil manejo, bajo costo y que permite la administración directa de sustancia a ensayar en el medio. Además su inclusión como biomodelo cumple con la recomendación de las agencias regulatorias de combinar varias especies que reflejen la diversidad del ecosistema (US.EPA, 1996 f). En el caso del molusco *Physa cubensis* es un caracol bentónico propio de la región tropical, representado en aguas lénticas dulceacuícolas, son fácilmente manipulables en el laboratorio; además el costo de sus cultivos y su concordancia ecológica lo favorecen frente a otros bioensayos estandarizados.

3.3.3.3 Sistema de ensayo

La especie seleccionada para este estudio fueron moluscos juveniles de menos de 72 h de *Physa cubensis*, obtenidos por cría artificial, con alimentación y condiciones controladas, en instalaciones preparadas para este propósito en el CBQ. Los organismos que se seleccionaron provinieron del mismo lote con buen estado de salud, y similar tamaño. Los especímenes para ensayo se seleccionaron por métodos taxonómicos de reconocimiento somático y de la concha.

3.3.3.4 Condiciones de mantenimiento y alimentación

Los moluscos se mantuvieron en las mismas condiciones durante los 7 días de aclimatación y durante el ensayo. Se emplearon vasos de polipropileno de 50 mL de capacidad con 15 mL de agua dechlorada con características químico-físicas aceptables para el ensayo (APHA, 1989): dureza de 10-250 mg/L CaCO₃, pH de 6.5-8, concentración de partículas por debajo de 20 mg/L, concentración de amonio, nitrato y cloro por debajo de 0.02 mg/L, 48mg/L y 0.003 mg/L, respectivamente. El número de individuos en cada vaso fue de 10. Todos los animales de la aclimatación pasaron al estudio definitivo por no observarse durante la aclimatación muertes ni indicadores de enfermedad o anomalía funcional o conductual.

Los recambios parciales de agua cada 48 h hasta los 30 días de duración del estudio fueron el medio usado para evitar la acumulación de residuos.

3.3.3.5 Condiciones ambientales

El local de ensayo mantuvo las siguientes variables climáticas:

Temperatura: 23±2 oC

Ciclos luz-oscuridad: 12/12 horas.

Iluminación: artificial.

El alimento diario consistió de un macerado estéril de Algas *Oscillatoria spp.*, procesado en el laboratorio y pienso para alevines producido y certificado por el CENPALAB, Cuba.

La alimentación se interrumpió 24 horas antes de comenzar el ensayo y se reanudó a las 96 horas, momento en que se eliminó el agua con la suspensión de prueba. A partir de este punto la alimentación fue diaria hasta el final del estudio a los 30 días.

3.3.3.6 Distribución y formación de grupos experimentales

Una vez obtenidas las formas juveniles de *P. cubensis* de una cohorte entre 0 a 72 h de eclosión, se procedió a la ejecución del ensayo. Se conformaron 3 grupos experimentales, uno con la sustancia de ensayo (10⁹ conidios/mL) y dos grupos controles, un control negativo con agua y otro con el producto Tricosave-34 (10⁹ conidios/mL) inactivado, ver Tabla 5.

Tabla 5. Grupos experimentales

| Grupos | # de moluscos | Concentración (conidios/mL) |
|--------------------|----------------------|------------------------------------|
| Tratado | 40 | 10⁸ |
| Control inactivado | 40 | 10⁸ |
| Control no tratado | 40 | - |

A cada grupo se le asignó aleatoriamente 40 moluscos, distribuidos en 4 réplicas de 10 individuos cada uno.

3.3.3.7 Vía de administración, dosis, frecuencia y duración.

La administración del producto activo e inactivado fue por suspensión en el agua de mantenimiento de los moluscos. El producto fue aplicado una sola vez en el agua y se mantuvo hasta las 96 horas. Como concentración límite fue utilizada 109 conidios/mL. Después de este tiempo se eliminó el producto y se renovó el agua en días alternos hasta 30 días posteriores, en que finalizó el ensayo.

3.3.3.8 Observaciones clínicas.

Los moluscos se observaron después de las 4 primeras horas y, al menos, a intervalos de 24 horas hasta completar el tiempo de estudio; registrándose las muertes y anomalías visibles. Para la discriminación de mortalidad se utilizó el criterio propuesto por Iannacone y Alvarino (1998,1999). Se consideró muerto el individuo incapaz de realizar algún tipo de movimiento en la placa de recuento, como mover el pie, la concha ó los tentáculos cefálicos durante 15 segundos de observación al estereoscopio. Para el caso de los efectos subletales, se consideró la desadherencia cuando el organismo ya no se desliza sobre las paredes del frasco perdiendo la capacidad de fijar el pie y el individuo se encuentra suspendido en el medio; desprendimiento cefálico cuando una porción del área cefálica se desprende e incrementa su tamaño al triple del normal.

Las variables de respuesta que se midieron fueron: mortalidad y efectos subletales (desadherencia y desprendimiento cefálico)

Como variables informativas se midieron: temperatura de local de ensayo, parámetros químicos físicos de calidad de agua, pH, conductividad, dureza del agua, concentración de metales pesados en el agua y viabilidad del hongo en el agua.

3.3.3.9 Eutanasia

La eutanasia se ejecutó mediante un método aceptado (congelación) y se trató de provocar el mínimo de sufrimiento a los animales.

3.3.4 Ensayo en abejas melíferas (*Apis mellifera*)

3.3.4.1 Métodos

Se evaluó la toxicidad aguda oral sobre *Apis mellifera* en un ensayo límite donde se aplicó de 10-100 veces la dosis recomendada para uso previsto. Las abejas fueron expuestas durante 4 horas en condiciones controladas a la sustancia prueba incluida en el alimento (solución de sacarosa al 50%). El ensayo se extendió por 30 días, evaluándose mortalidad, y eventos clínicos subletales.

Este ensayo se desarrolló teniendo en cuenta lo establecido por las agencias regulatorias (EPPO, 1992; US-EPA, 1996 a,b,c) y otra guía de la EPA sobre generalidades en evaluación de plaguicidas microbianos (US-EPA, 1996 d).

3.3.4.2 Fundamentación del biomodelo empleado

Las abejas constituyen indicadores biológicos adecuados debido a que estos organismos habitan en lugares que pueden estar expuestos al uso de bioplaguicidas. La contaminación con los mismos se puede producir por contacto, y mediante la obtención de néctar y polen durante sus labores de polinización. Además estos invertebrados al contaminar a su vez los productos de su colmena, pueden extender la toxicidad a otros organismos incluyendo al hombre.

3.3.4.3 Sistema de ensayo

El sistema de ensayo estuvo formado por abejas obreras jóvenes (aproximadamente de la misma edad) *Apis mellifera*, procedentes de igual colonia del Centro Provincial de Cría de Reinas, libres de patógenos conocidos y sin tratamientos con antibióticos, o productos anti-varroa en las 4 semanas precedentes a la recepción de ellas para el estudio.

3.3.4.4 Condiciones de mantenimiento y alimentación

Para el mantenimiento de las abejas se utilizaron estuches de macrolon recomendados por la OMS para el traslado y mantenimiento de insectos, con dimensiones de 4 cm de diámetro y 12 cm de longitud; con extremos cerrados, siendo uno de ellos una rejilla plástica para garantizar la permanencia de los organismos dentro, con una entrada de aire. Los estuches con las abejas (10 por estuche) se mantuvieron durante el ensayo en la oscuridad, en una incubadora, a una temperatura de 30 ± 2 °C. Los procedimientos de manejo se ejecutaron a la luz. Se les proveyó a voluntad de una solución acuosa de sacarosa al 50 %, monitoreándose el consumo.

3.3.4.5 Distribución y formación de grupos experimentales

Los animales con buen estado de salud se distribuyeron aleatoriamente, a 3 grupos experimentales, uno con la sustancia de ensayo (109 conidios/mL) y dos grupos controles, un control negativo con solución de sacarosa al 50 % y otro con el producto Tricosave-34 (109 conidios/mL) inactivado. A cada grupo se le asignó 30 abejas, distribuidas en 3 réplicas de 10 abejas cada uno. Durante el proceso de aleatorización y asignación a los grupos experimentales las abejas fueron sedadas con 10 dm³ de CO₂/minuto durante 5 minutos.

3.3.4.6 Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

La administración del producto activo e inactivado fue por medio alimento. Se preparó una suspensión madre concentrada del producto para tomar el volumen necesario a mezclar con la solución azucarada 50 % de manera que obtuvimos la suspensión con la concentración de estudio.

La exposición al producto fue única, durante 4 horas, después de este tiempo se retiró y se suministró agua con sacarosa al 50 % ad libitum diario y durante 30 días más. Se verificó la viabilidad del hongo en la solución azucarada al terminar las 4 horas de exposición.

3.3.4.7 Observaciones clínicas

Se realizaron observaciones clínicas a las 4, 24, 48 horas y diariamente hasta los 30 días.

Las variables clínicas de respuesta fueron: mortalidad, signos de toxicidad o enfermedad (alteraciones fisiológicas y/o conductuales): a) ataxia, b) letargo, c) hipersensibilidad.

Como variables informativas se midieron: temperatura, humedad relativa y viabilidad del hongo en el agua.

3.3.4.8 Eutanasia

La eutanasia se ejecutó mediante métodos aceptados y se trató de provocar el mínimo de sufrimiento a los animales (10 dm³ de CO₂/minuto durante 20 minutos).

3.3.4.9 Estudio microbiológico

Al no observarse muertos o moribundos, los sobrevivientes se sacrificaron al concluir el experimento, para verificar la viabilidad de propágulos del hongo (UFC).

Se analizó la presencia de propágulos fúngicos viables en el alimento a las 4 h.

3.3.4.10 Análisis estadístico

Se determinaría el porcentaje de mortalidad para ambos grupos y se realizaría una comparación de medias mediante un ensayo paramétrico o no (según sean los supuestos estadísticos) con un nivel de significación de $p < 0.05$.

Para el cálculo de CL₅₀ a los diferentes tiempos observaciones (48 horas + 30 días) se utilizaría el programa de la EPA (EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM. USED FOR CALCULATING LC/EC VALUES Versión 1.5.)

En nuestro caso no se determinó el porcentaje de mortalidad al no observarse muerte en ningún grupo ni tiempo de observación.

3.3.5 Ensayo en peces guppy (*Poecilia reticulata*)

3.3.5.1 Métodos

La prueba se basó en la determinación de efectos de intoxicación aguda (inmovilización o mortalidad), observados en un tiempo de exposición de 96 horas, en juveniles del pez dulceacuícola *Poecilia reticulata* ("guppy").

Durante este ensayo se expuso al organismo seleccionado a la sustancia de ensayo a una concentración de máximo riesgo de 10⁹ conidios/mL. De provocarse efectos deletéreos los peces se exponen a una serie de cinco concentraciones decreciente con factor geométrico y se evalúa la mortalidad y eventos clínicos subletales cada 24 horas y hasta el término del bioensayo (96 horas). Los datos de mortalidad acumulada permiten construir la gráfica

concentración-efecto, que es la base para la determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀).

El ensayo se desarrolló teniendo en cuenta lo establecido por las agencias regulatorias (EPA, 1996 h,i).

3.3.5.2 Fundamentación del biomodelo empleado

La relevancia del empleo de peces como organismos de prueba radica en su ubicación y función en los sistemas acuáticos, ya que además de ocupar diferentes posiciones tróficas en los ecosistemas, muchas especies de peces representan pesquerías de importancia comercial o son sujeto de cultivo para la producción de alimentos o como especies ornamentales. Su hábitat es el ecosistema de mayor extensión y vulnerabilidad a la contaminación. Además, al tratarse de organismos vertebrados, son normalmente considerados como buenos representantes de organismos de mayor complejidad y por lo tanto los efectos tóxicos observados en ellos son más fáciles de comprender e interpretar. La especie seleccionada se caracteriza por su pequeño tamaño, rápido desarrollo, alta fecundidad, fácil manejo, bajo costo y que permite la administración directa de sustancia a ensayar en el medio. Es recomendada en varias guías para estudios ecotoxicológicos (US EPA, 1996 i; OECD, 1984; OECD, 1992).

3.3.5.3 Sistema de ensayo

Se utilizó como organismo prueba individuos juveniles de *Poecilia reticulata*, del mismo lote, provenientes de reproductores estabilizados en las condiciones para la especie en instalaciones preparadas para este propósito en el CBQ. Los organismos que se seleccionaron tenían buen estado de salud, similar edad y un rango de longitud de 2 ± 1 cm.

3.3.5.4 Condiciones de mantenimiento y alimentación

Todos los animales de la aclimatación pasaron al estudio definitivo por no observarse durante la aclimatación muertes ni indicadores de enfermedad o anomalía funcional o conductual.

Los peces se mantuvieron en las mismas condiciones durante los 7 días de aclimatación y durante el ensayo. Se emplearon recipientes de vidrio, de 5L de volumen y 300 cm² de área, con 1L de agua potable declorada (reposo a la luz por 48h), y características químico-físicas aceptables para el ensayo: dureza de 40-180 mg/L CaCO₃, pH de 7,4, temperatura

de 23 ± 2 °C, concentración de partículas por debajo de 20 mg/L y metales en rangos aceptables para este tipo de agua. La densidad de peces fue de 1g/L, (10 individuos en 1 L) adecuada para garantizar no se rebase la carga máxima que puede tolerar el sistema en función de la oxigenación y los residuos de amoníaco.

El sifoneo de heces y alimentos fue realizado dos horas después de la alimentación y los recambios parciales de agua cada 48 h, estos fueron los medios utilizados para evitar la acumulación de estos residuos.

La alimentación diaria fue con pienso para alevines (producido y certificado por el CENPALAB, Cuba). Esta se interrumpió 24 horas antes de comenzar el ensayo y se reanudó a las 96 horas, para ser de aplicación diaria hasta el final del estudio a los 30 días.

3.3.5.5 Condiciones ambientales

El local de alojamiento de las peceras mantuvo las siguientes variables climáticas:

Temperatura: 25 ± 2 °C

Ciclos luz-oscuridad: 12/12 horas.

Iluminación: Luz blanca de 1000Lux (30-100 lm para un área de 0.03m²)

3.3.5.6 Distribución y formación de grupos experimentales

Se conformaron 3 grupos experimentales, uno con la sustancia de ensayo (109 conidios/mL) y dos grupos controles, un control negativo con agua y otro con el producto Tricosave-34 inactivado (109 conidios/mL). A cada grupo se le asignó aleatoriamente 20 peces, distribuidos en 2 réplicas de 10 individuos cada uno.

3.3.5.7 Vía de administración, dosis, frecuencia y duración

La administración del producto activo e inactivado fue por suspensión en el agua de mantenimiento de los peces. Como concentración límite se utilizó 10^9 conidios/mL. El producto se aplicó una sola vez en el agua y se mantuvo hasta las 96 horas, al cabo del cual se eliminó agua con el producto y se renovó el agua.

3.3.5.8 Observaciones clínicas

Los peces se observaron después de las 4 primeras horas y, a intervalos de 24 horas hasta completar el tiempo de estudio. Se registraron las anomalías visibles (por ejemplo, pérdida de equilibrio, cambios en la actividad locomotora y natatoria, función respiratoria, pigmentación, cambios en la conducta alimentaria).

Los peces se consideraron muertos si al toque del pedúnculo caudal no se produce reacción alguna y no se percibió ningún movimiento respiratorio. Se realizó necropsia para detectar alteraciones orgánicas y muestreo para verificar la presencia de UFC a partir de cultivo.

Las variables de respuesta que se midieron fueron: mortalidad y los efectos subletales (nado errático, pérdida de reflejos, excitabilidad incrementada, letargo, decoloración, producción excesiva de mucus, hiperventilación, ojos opacos, espina curvada, hemorragias y otros que no aparezcan relacionados), así como peso inicial y final.

Como variables informativas se midieron: temperatura e intensidad de luz del local, temperatura, pH, conductividad, dureza, metales pesados y viabilidad del hongo en el agua.

3.3.5.9 Peso corporal

Se midió el peso al inicio del ensayo y al finalizar el mismo. Para ello se pesaron individualmente los peces en beaker de 50 mL de agua que fueron tarados antes de introducir los peces capturados de la pecera con una malla fina.

3.3.5.10 Eutanasia

La eutanasia se ejecutó mediante inducción de anestesia con mentol a la concentración de 200 mg/L en el agua de mantenimiento por un período de 10 minutos y posteriormente la decapitación de los mismos con un bisturí.

3.3.5.11 Estudio microbiológico

Al no observarse muertos o moribundos, los sobrevivientes se sacrificaron al concluir el experimento, para identificar la presencia de hifas. Se analizó la presencia de propágulos fúngicos viables en agua del ensayo a las 96 h.

3.3.5.12 Análisis estadísticos

Se utilizaría el método de Análisis de Varianza de un factor (ANOVA-ONEWAY), implementado en el programa StatGraphics Centurión versión 15.II, para contrastar la hipótesis de que las medias de los pesos en los diferentes grupos (tratado, control inactivado y control negativo) son semejantes al inicio y las medias de los pesos de dichos grupos son semejantes al final del estudio. En el análisis estadístico se consideró un nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

No se determinó el porcentaje de mortalidad al no observarse muerte en ningún grupo ni tiempo de observación. Así mismo, al no observarse mortalidad no fue necesario calcular la CL₅₀.

4. Resultados

4.1 Ensayo de germinación y elongación de la raíz en lechuga (*Lactuca sativa*)

Al evaluar el efecto del bioplaguicida Tricosave-34 sobre la germinación de semillas de lechuga (Gráfico # 2), se comprobó que las semillas del grupo control germinaron al 100 %, y que en las semillas de los grupos tratados la inhibición de la germinación no sobrepasó el 10% en la máxima concentración ensayada de 10^{11} conidios/mL, estando de 1 a 10 el porcentaje de inhibición para las concentraciones inferiores. Debido a que en todas las concentraciones ensayadas la inhibición de la germinación estuvo por debajo del 50 % no se pudo estimar la CI_{50} , por lo que declaramos que la $CI_{50} > 10^{11}$ conidios/mL.

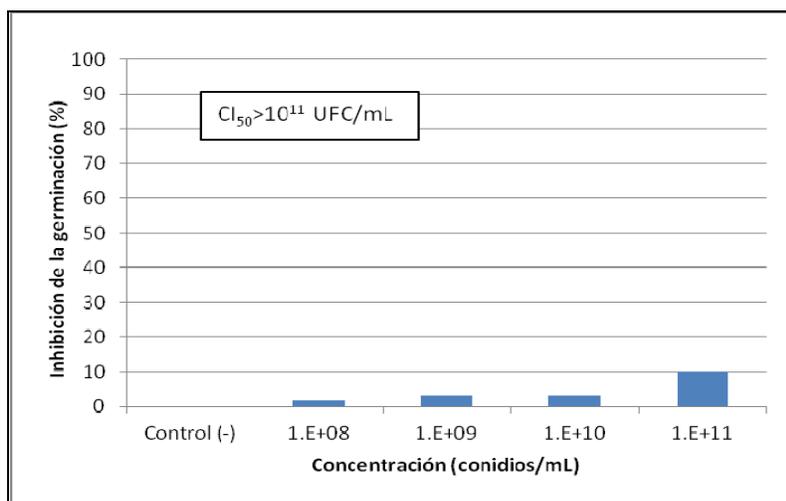


Gráfico # 2. Efecto del Tricosave-34 sobre la germinación de semillas de lechuga.

El Gráfico# 3 muestra los resultados del efecto de las suspensiones de Tricosave-34 sobre la elongación de las raíces, apreciándose que a partir de la concentración de 10^{10} conidios/mL hay una significativa reducción en la elongación radicular ($p < 0,01$).

En cambio, en la concentración 10^9 conidios/mL se observa una estimulación aunque no es significativa respecto al control.

La CI_{50} , estimada utilizando el ajuste a una curva sigmoide (Holford, 1981), fue de 3.5×10^{10} conidios/mL, con lo cual este indicador de daño subletal se produce a concentraciones mayores que la propuesta para el registro del producto. No se observaron otros signos de toxicidad macroscópica ni histopatológica a las concentraciones evaluadas.

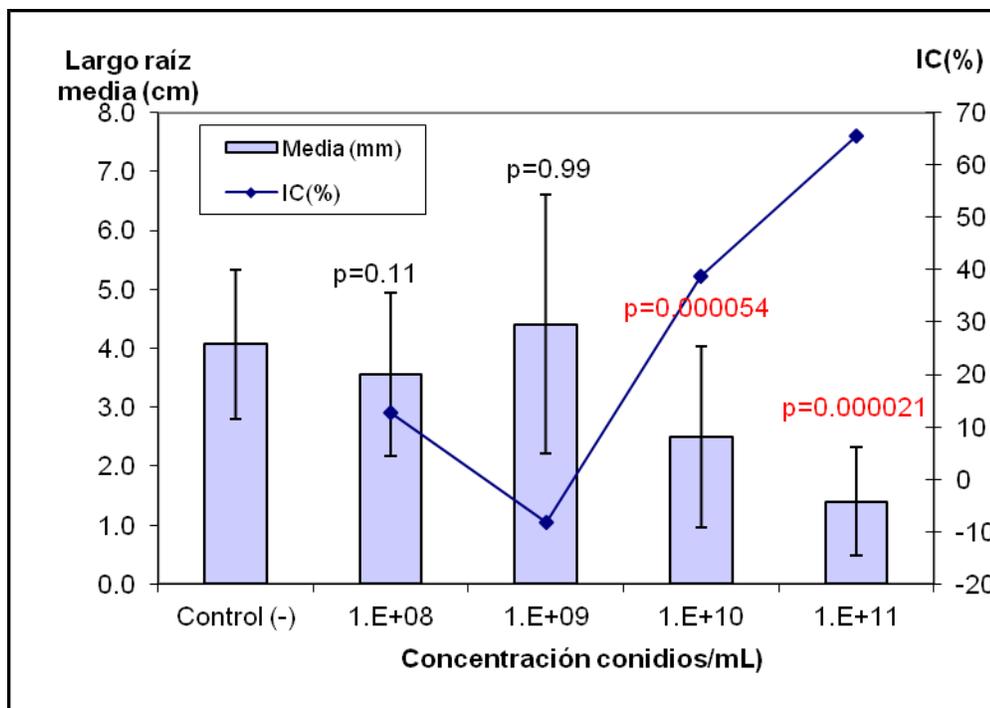


Grafico # 3. Inhibición de la elongación de la raíz del Tricosave-34 en semillas de lechuga

4.2 Ensayo en lombriz (*Eisenia foetida*)

Al evaluar el efecto agudo del bioplaguicida Tricosave-34 sobre *Eisenia foetida* (Tabla 6) se comprobó que las lombrices de ambos grupos, control y tratado con la concentración de 10^9 conidios/mL no presentaron mortalidad en los tiempos de 24 y 48 horas, por lo que no se extendió el ensayo hasta las 72 h.

Tabla 6. Evaluación de la mortalidad del Tricosave-34 sobre *Eisenia foetida*

| Grupo | Réplica | Mortalidad % | |
|---|---------|--------------|------|
| | | 24 h | 48 h |
| Control | 1 | 0 | 0 |
| Tratado Conc 1x10 ⁹ conidios/mL | 1 | 0 | 0 |
| | 2 | 0 | 0 |
| | 3 | 0 | 0 |

En la evaluación de otros efectos a las 24 horas se apreció que tanto los especímenes pertenecientes al grupo control como los que conformaron el grupo tratado se mantuvieron con buena vitalidad, evidenciado por la excelente respuesta a la estimulación mecánica y la ausencia de otros signos.

Transcurridas 48 horas se observó una ligera disminución de la respuesta al estímulo mecánico en una lombriz perteneciente del grupo tratado. Este evento subletal apenas representa el 3,3% de las lombrices del grupo de ensayo.

De forma general se consideró que el producto no es tóxico para esta especie bajo las condiciones del ensayo.

4.3 Ensayo en moluscos (*Physa cubensis*)

Se consideró válida la prueba pues al final del período de exposición no se detectó mortalidad en el control; así mismo se corroboró la presencia del hongo en el agua de ensayo a las 96 horas de iniciado el experimento lo que evidenció la interacción del microorganismo con el modelo de estudio (Tabla 7). Asimismo no se observó mortalidad, ni efectos clínicos subletales en los moluscos que estuvieron expuestos al biopreparado en el agua a la concentración de 10^9 conidios/mL, en ninguno de los tiempos preestablecidos para este ensayo (Tabla 8). Se pudo verificar la formación de UFC en los cultivos hechos con muestras del agua de ensayo a las 96 h (Tabla 9).

Sin embargo en los cultivos preparados a partir de muestras de los tejidos del animal, no pudimos detectar UFC siendo evidente que el biopreparado no es infectivo para *Physa cubensis*.

Tabla 7. Viabilidad de *Trichoderma harzianum* a las 96 h en el agua.

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico del agua | |
|--------------------|----------|--|----------|
| | | 0 horas | 96 horas |
| Tratado | 1 (n=10) | Positivo | Positivo |
| | 2 (n=10) | Positivo | Positivo |
| | 3 (n=10) | Positivo | Positivo |
| | 4 (n=10) | Positivo | Positivo |
| Control inactivado | 1 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 2 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 3 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 4 (n=10) | Negativo | Negativo |
| Control negativo | 1 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 2 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 3 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 4 (n=10) | Negativo | Negativo |

Tabla 8. Mortalidad y eventos clínicos en *Physa cubensis* por tratamiento con Tricosave-34 (10^9 conidios/mL)

| Grupo | Réplicas | Mortalidad | | Efectos subletales | |
|--------------------|-----------|------------|---------------|--------------------|---------------|
| | | 0-96 horas | hasta 30 días | 0-96 horas | hasta 30 días |
| Tratado | 1 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 3 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control inactivado | 5 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 6 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 7 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Control negativo | 9 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 11 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 12 (n=10) | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabla 9. Presencia de *Trichoderma harzianum* en moluscos *Physa cubensis* a los 30 días de ensayo

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico de los órganos |
|--------------------|----------|--|
| Tratado | 1 (n=10) | negativo |
| | 2 (n=10) | negativo |
| Control inactivado | 4 (n=10) | negativo |
| | 5 (n=10) | negativo |
| Control negativo | 7 (n=10) | negativo |
| | 8 (n=10) | negativo |

4.4 Ensayo en abejas (*Apis mellifera*)

Al final del período de exposición de 4 horas no se detectó mortalidad en el control, dándose por válida la prueba. En ese período de observación tampoco se observó mortalidad, ni signos de intoxicación para los grupos que recibieron al producto Tricosave-34 (109 conidios/mL) activo o inactivado (Tabla 10). En la verificación realizada de viabilidad del hongo en el alimento luego de 4 horas (tiempo de exposición) se pudo constatar la presencia UFC (Tabla 11). Siendo evidente entonces que el hongo viable no fue capaz de provocar mortalidad, ni signos de intoxicación incluso 30 días después, cuando se dió por concluido el ensayo (Tabla 11). Igualmente resultaron negativos los cultivos de muestras de las abejas al cabo de 30 días, lo que indica la no infectividad de *Trichoderma harzianum* para estos artrópodos (Tabla 12).

Tabla 10. Mortalidad y signos clínicos en *Apis mellifera* tratada con Tricosave-34 (109 conidios/mL).

| Grupo | Réplicas | Mortalidad y signos clínicos | | |
|------------------|----------|------------------------------|------------|---------------|
| | | 0-4 horas | 4-48 horas | hasta 30 días |
| Tratado | 1 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 2 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 3 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| Control inactiva | 4 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 5 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 6 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| Control negativo | 7 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 8 (n=10) | 0 | 0 | 0 |
| | 9 (n=10) | 0 | 0 | 0 |

Tabla 11. Viabilidad de *Trichoderma harzianum* a las 4 h en agua azucarada al 50%.

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico del alimento | |
|--------------------|----------|--|----------|
| | | 0 horas | 4 horas |
| Tratado | 1 (n=10) | Positivo | Positivo |
| | 2 (n=10) | Positivo | Positivo |
| | 3 (n=10) | Positivo | Positivo |
| Control inactivado | 4 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 5 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 6 (n=10) | Negativo | Negativo |
| Control negativo | 7 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 8 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 9 (n=10) | Negativo | Negativo |

Tabla 12. Presencia de *Trichoderma harzianum* en *Apis mellifera* a los 30 días.

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico de los órganos |
|--------------------|----------|--|
| Tratado | 1 (n=10) | negativo |
| | 2 (n=10) | negativo |
| | 3 (n=10) | negativo |
| Control inactivado | 4 (n=10) | negativo |
| | 5 (n=10) | negativo |
| | 6 (n=10) | negativo |
| Control negativo | 7 (n=10) | negativo |
| | 8 (n=10) | negativo |
| | 9 (n=10) | negativo |

4.5 Ensayo en peces (*Poecilia reticulata*)

Se consideró válida la prueba pues al final del período de exposición no se detectó mortalidad en el control. Asimismo no se observó mortalidad, ni efectos clínicos subletales en ninguno de los tiempos preestablecidos para este ensayo 4, 24, 48, 96 h y 30 días en los peces que estuvieron expuestos en el agua al biopreparado, activo o inactivado, a la concentración de 10^9 conidios/mL (Tabla 13).

Tabla 13. Mortalidad en peces *Poecilia reticulata* en el ensayo con Tricosave-34.

| Grupo | Réplicas | Mortalidad | |
|------------------|----------|------------|---------------|
| | | 0-96 horas | hasta 30 días |
| Tratado | 1 (n=10) | 0 | 0 |
| | 2 (n=10) | 0 | 0 |
| Control inactivo | 3 (n=10) | 0 | 0 |
| | 4 (n=10) | 0 | 0 |
| Control negativo | 5 (n=10) | 0 | 0 |
| | 6 (n=10) | 0 | 0 |

Se apreció que el peso al inicio del ensayo en todos los grupos estuvo cercano a los 97 mg y que este se incrementó en todos los grupos hasta una media cercana a 200 mg, tabulándose la media e intervalo de confianza para cada grupo en Tabla 14.

Tabla 14. Pesaje de peces *Poecilia reticulata* en el ensayo con Tricosave-34.

| | Grupo | N | Media (mg) | Intervalo de confianza para la media al 95% | |
|-----------------|--------------------|----|---------------|--|-----------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Pesos al inicio | Tratado | 20 | 97.75 | 97.07 | 98.43 |
| | Control inactivado | 20 | 97.00 | 96.37 | 97.63 |
| | Control negativo | 20 | 97.05 | 96.45 | 97.65 |
| | Total | 60 | 97.27 | 96.91 | 97.62 |
| Pesos al final | Tratado | 20 | 204.65 | 202.66 | 206.64 |
| | Control inactivado | 20 | 203.90 | 201.86 | 205.94 |
| | Control negativo | 20 | 205.55 | 204.50 | 206.60 |
| | Total | 60 | 204.70 | 203.70 | 205.67 |

Se estudió además la influencia del tratamiento sobre el peso como indicador de toxicidad; primeramente se comprobaron los supuestos paramétricos, normalidad de los pesos por grupo y la homogeneidad de varianza. En el primer caso se usó el estadígrafo Shapiro-Wilk y se demostró que la variable peso (inicial y final) sigue una distribución normal por grupos ($p > 0.05$). En el segundo caso se utilizó la prueba de Levene sobre igualdad de varianza y se observó que para el peso inicial hay homogeneidad de varianza ($p = 0.770$). Sin embargo esto no se cumple para el peso final ($p = 0.017$), sin embargo por tratarse de un experimento equilibrado el análisis de varianza no es tan sensible a la violación de esta hipótesis y se da por válido arrojando que no hay diferencias significativas entre los grupos tanto en los pesos iniciales como finales ($p > 0.05$). Se complementó el estudio de análisis de varianza con los estadísticos de Brown-Forsythe y de Welch. Estos estadígrafos confirman que no hay diferencias significativas en los pesos iniciales y finales entre los grupos ($p > 0.05$) y por lo

tanto se concluye que incluimos en el estudio individuos homogéneos en relación al peso y además que el tratamiento no afectó la fisiología de los peces, puesto que controles y tratados tuvieron igual incremento.

Se pudo constatar la presencia de propágulos fúngicos viables (UFC) en los cultivos hechos con muestras del agua de ensayo a las 96 h (Tabla 15). No se observaron UFC en los cultivos preparados a partir de muestras de los tejidos del animal ni daños histopatológicos, siendo evidente que el biopreparado no es infectivo ni patogénico para los peces (Tabla 16 y 17).

Tabla 15. Viabilidad de *Trichoderma harzianum* a las 96 h en el agua.

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico del agua | |
|--------------------|----------|--|----------|
| | | 0 horas | 96 horas |
| Tratado | 1 (n=10) | 10 ⁹ | Positivo |
| | 2 (n=10) | 10 ⁹ | Positivo |
| Control inactivado | 3 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 4 (n=10) | Negativo | Negativo |
| Control negativo | 5 (n=10) | Negativo | Negativo |
| | 6 (n=10) | Negativo | Negativo |

Tabla 16. Infectividad de Tricosave-34 en peces *Poecilia reticulata* a los 30 días de ensayo.

| Grupo | Réplicas | Resultados del cultivo microbiológico de muestras del pez |
|--------------------|-----------------|--|
| Tratado | 1 (n=10) | negativo |
| | 2 (n=10) | negativo |
| Control inactivado | 4 (n=10) | negativo |
| | 5 (n=10) | negativo |
| Control negativo | 7 (n=10) | negativo |
| | 8 (n=10) | negativo |

Tabla 17. Patogenicidad de Tricosave-34 en peces *Poecilia reticulata* a los 30 días de ensayo.

| Grupo | Réplicas | Resultados histopatológicos de los órganos |
|---------------------------|-----------------|---|
| Tratado | 1 (n=10) | Normal |
| | 2 (n=10) | Normal |
| Control inactivado | 4 (n=10) | Normal |
| | 5 (n=10) | Normal |
| Control negativo | 7 (n=10) | Normal |
| | 8 (n=10) | Normal |

5. Discusión

5.1 Planta

En el estudio de evaluación de efectos del tricosave-34 sobre la germinación y elongación de la raíz de plantas terrestres (*Lactuca sativa*) se observó un efecto dosis-dependiente, es decir, a la concentración prevista para aplicar a cultivos se observó un ligero efecto estimulante sobre la germinación de semillas. Este resultado coincide con otros estudios realizados por González y colaboradores donde se apreció que este microorganismo tuvo efectos positivos sobre varios parámetros indicadores de desarrollo vegetativo en diferentes especies de plantas (Gonzalez, et al.,1999). De hecho ha sido referido que actúa como bioestimulante del crecimiento radicular, pues promueve un desarrollo de raíces más fuertes y sanas debido a la secreción de fitohormonas, lo que permite, debido al incremento de masa radicular, una mejor asimilación de nutrientes y toma de humedad por la planta (Romero, 2006).

Contradictoriamente a concentraciones significativamente más elevadas (entre 1010 y 1011 conidios/ml) que la prevista para aplicar a cultivos el efecto sobre la germinación y elongación de la raíz fue inhibitorio aunque no estadísticamente significativo. Este hallazgo concuerda con resultados previos que explican que *Trichoderma* es un hongo altamente antagónico, con lo cual altas aplicaciones de *Trichoderma* posiblemente pueden alterar poblaciones de hongos y bacterias que hay en el suelo, importantes en el ciclaje de la energía y nutrientes. *Trichoderma harzianum* particularmente puede disminuir las poblaciones de hongos no patógenos descomponedores de la materia orgánica, alterando el equilibrio biológico de los suelos y por consiguiente se disminuye la fertilidad de estos y con ello el crecimiento vegetativo de la planta (Borrero, 2005).

Trichoderma harzianum, es un microorganismo de ocurrencia natural en el suelo, que es favorecido por la presencia de abundantes niveles de raíces en las plantas, las cuales coloniza rápidamente para adicionalmente potenciar el crecimiento de las mismas y de la planta en sí, ya que posee características que le permiten solubilizar y secuestrar nutrientes orgánicos para ponerlos a disposición de las mismas, mejorando en dicha forma su desarrollo (Hoja de seguridad.AgroGuard, 2003).

Además, las especies del género *Trichoderma* pueden producir diversos metabolitos secundarios dentro de los que se encuentran algunas toxinas como la gliotoxina (Brian,

1944) (Argumedo-Delira, R., et al. 2009), y hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas (Argumedo-Delira, R., et al. 2009) (Kleifeld, 1992). Así, *T. harzianum* y otras especies del género son capaces de incrementar el crecimiento de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L) (Di Pietro, A., et al. 1993)

De forma general el producto se consideró poco fitotóxico para esta especie. Incluso considerando los antecedentes mencionados la concentración propuesta para su uso más bien exhibe efectos benéficos para la producción agrícola (Esposito, 1998).

5.2 Lombriz

De los resultados obtenidos al evaluar el Tricosave-34 en el ensayo de toxicidad aguda en *Eisenia foetida* respecto a mortalidad, podemos deducir que la CL50 es superior a la concentración ensayada, que por ser 10 veces más alta que lo previsto para aplicación agrícola demuestra la seguridad del biopreparado.

5.3 Molusco

En el estudio de toxicidad en moluscos *Physa cubensis* no se obtuvieron niveles de mortalidad en los organismos en prueba, pero si se determinó la viabilidad por al menos 24 horas del microorganismo en el agua de ensayo. Dicho resultado coincide con resultados previos de evaluación de diferentes medios de conservación alternativos sobre la viabilidad de la cepa A-34 de *Trichoderma harzianum* que afirman que la suspensión en agua no afecta la viabilidad de la cepa, morfología y capacidad antagónica durante un año en un 50% (Rodríguez, 2010).

La no presencia de UFC del microorganismo en muestras tomadas de moluscos en ensayo ha sido además referida para otros invertebrados. Sin embargo, se ha planteado que las toxinas de *Trichoderma koningii* pueden acumularse en mariscos y mejillones (Sallenave et al; 1999), por lo que es conveniente seguir investigando el efecto sobre otros moluscos, de considerarse de interés ecológico en particular.

5.4 Abeja

En el ensayo de toxicidad en abejas melíferas, *Apis mellifera*, no se observó efecto alguno de toxicidad medido por producción de mortalidad y otros efectos no letales y a concentraciones más elevadas que las previstas para aplicar en campo. Nuestro resultado es coherente con estudios precedentes que consideran al hongo *Trichoderma harzianum* un

producto no tóxico ni alergénico, e inocuo para artrópodos útiles, abejas y abejorros (Kacaniova *et al.*, 2012).

En estudios reportados se refiere DL50 en abejas los valores fueron mayores a 100 mg/abeja, por lo que se considera de baja toxicidad (Hoja de seguridad Funqui, 2014).

De acuerdo a las recomendaciones de uso comercial, en tratamientos de campo, no se ha encontrado toxicidad de *Trichoderma harzianum* en poblaciones de abejas, de hecho existen reportes de literatura en los cuales las abejas han sido empleadas como organismos para la diseminación del hongo (Hoja de seguridad. AgroGuard, 2003).

5.5 Peces

Respecto al estudio de toxicidad en peces dulceacuícolas *Poecilia reticulata*, no se observaron evidencias de toxicidad demostrable mediante mortalidad y efectos subletales. Existen algunos reportes de toxicidad de *Trichoderma spp.* en *Artemia salina*, (Solfrizzo *et al.*, 1994), cerdo y jabalí (Peltola *et al.*, 2004), y en humanos (Eduard, 2009, Chouaki *et al.*, 2013). Sin embargo para peces no hemos hallado referencias de toxicidad en embriones larvas o adultos de varias especies en los que se ha podido verificar su presencia en órganos (Bagy *et al.*, 1993). Por añadidura, ha sido sugerido como aditivo o alimento liofilizado para el pez dulceacuícola *Danio rerio* o Pez Cebra, precisamente por no causar ningún efecto tóxico en los adultos y su descendencia (Sisman *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con los nuestros y permite declarar al Tricosave-34 como no tóxico para los peces.

Además, *Trichoderma harzianum*, es un microorganismo de ocurrencia natural en el suelo. De acuerdo con la literatura publicada a la fecha, son prácticamente inexistentes las referencias acerca de la recuperación de especies de *Trichoderma spp.* a partir de ambientes acuáticos. Según la literatura parece existir una aparente inhabilidad de *Trichoderma harzianum* para establecerse en hábitats acuáticos y a la fecha no existen reportes de efectos adversos de este microorganismo en peces y otros organismos acuáticos (Hoja de seguridad AgroGuard, 2003).

No obstante varias fuentes reportan la evaluación de *Trichoderma* en peces debido a que metodológicamente se recomienda. En estos estudios la CL50 en peces fue mayor a 100 ppm, por lo que no se consideró tóxico (Hoja de seguridad Funqui, 2014).

De manera general son varios los reportes bibliográficos que avalan la seguridad ecológica del hongo *Trichoderma harzianum* sobre múltiples organismos bioindicadores del medio ambiente reconocidos por las principales guías internacionales de evaluación de efectos de plaguicidas y bioplaguicidas. Se reporta que *Trichoderma* no crece ni se desarrolla en el agua, y tiene una vida media de 5.5 semanas. Como el hongo no permanece activo en el agua, no requiere de procedimientos de descontaminación en caso de derrames ya que es un componente natural del suelo. No forma emulsiones. La movilidad en el aire no se considera pertinente porque la liberación de esporas, no es probable que ocurra a niveles significativos. El movimiento de grandes cantidades de esporas a través de la tierra en general no es probable. No se acumula en el ambiente (Hoja de seguridad 3Tac(wp) BIO-FUNGUICIDA, 2012).

Las pruebas demuestran que el hongo no es tóxico a los mamíferos, aves, ranas, abejas, lombrices, peces e invertebrados acuáticos (Hoja de Seguridad Trichogen WP, 2014) y (Hoja de Seguridad Trichosil® 50 WP, 2014).

La literatura actual en Internet, relacionada con este hongo, cita las fichas de seguridad y aspectos generales de preparados y productos bioplaguicidas preparados con el microorganismo, debido fundamentalmente al amplio uso que desde hace varias décadas se realiza con especies de *Trichoderma spp.* y en otros casos combinaciones con otros hongos para uso en el control de plagas en cultivos varios y en plantas ornamentales. Así tenemos productos como el 3Tac (wp) BIO-FUNGUICIDA, mezcla de *Trichoderma viride*, *Trichoderma Harzianum*, *Trichoderma Longibrachiatum* (Hoja de seguridad 3Tac(wp) BIO-FUNGUICIDA, 2012); el TRICHONATIVA® SC, combinación de *Trichoderma harzianum* cepa Queule, *Trichoderma virens* cepa Sherwood, *Trichoderma parceramosum* cepa Trailes (Hoja de seguridad TRICHONATIVA®, 2013), entre otros.

En general el proceso de la Administración de Riesgo Ambiental se divide en una etapa de Evaluación del Riesgo, que entrega información científica sobre la probabilidad que ocurra un daño en las especies expuestas, y en una Administración del Riesgo, en que se elaboran y aplican las políticas o normas de regulación para el control del posible efecto (Medina y Encina-Montoya, 2003).

La presencia de un contaminante en el ambiente y sus efectos ecológicos puede ser determinado mediante el uso de biomarcadores o marcadores biológicos (Fossi ,1991), (Peakall y Shugart, 1992) . Estos corresponden a la medición de respuestas moleculares,

bioquímicas y fisiológicas que produce la presencia de un agente contaminante en un organismo determinado. El material biológico utilizado como biomarcador incluye ácidos nucleicos y proteínas (enzimas), organelos, células, tejidos y órganos. Estos análisis pueden desarrollarse en el laboratorio, exponiendo una especie para la cual las reacciones a medir están ya establecidas; o pueden efectuarse en terreno, mediante la mantención de estos organismos en el cuerpo de agua que se desea evaluar (Melacon, 1995).

La valoración de riesgo ambiental se realiza básicamente considerando los resultados ecotoxicológicos realizados en especies bioindicadoras, estos ensayos generalmente se realizan como una batería de experimentos con un orden lógico y considerando el tipo de producto a evaluar, el uso previsto, los niveles o cantidades que serán aplicados en el ambiente, entre otros.

La batería de ensayos que propusimos y considerando los niveles tróficos del ecosistema fue:

- Un organismo productor: semillas de planta terrestre (*Lactuca sativa*).
- Un organismo descomponedor y detritivoro: lombrices terrestres (*Eisenia foetida*).
- Un organismo consumidor primario: moluscos (*Physa cubensis*).
- Un organismo consumidor primario: abejas (*Apis mellifera*).
- Un organismo consumidor primario/secundario: peces (*Poecilia reticulata*).

El producto Tricosave-34 se aplicará sobre cultivos terrestres de interés económico, por lo cual predominan en dicha batería organismos bioindicadores de ecosistemas terrestres y solo dos organismos acuáticos, peces y moluscos, aunque este último alterna fases de vida en medio acuático y terrestre; debido a que las guías internacionales los recomiendan como medida de riesgo por vertimientos accidentales o por arrastre o inundaciones que ocurran naturalmente.

En el caso de los resultados obtenidos con Tricosave-34 no se hace necesario realizar una evaluación medioambiental integral debido a la ausencia casi total de toxicidad en los organismos ensayados. Teniendo en cuenta los datos referidos en general no hay estudios que sugieran que *Trichoderma harzianum* tenga ningún efecto perjudicial demostrable sobre el medio ambiente, por lo que considerando la metodología de clasificación de la US-EPA esta se clasifica como Categoría IV, es decir, producto de Baja Toxicidad (OECD, 2001).

6. Conclusiones

1. El bioplaguicida Tricosave-34 no es tóxico para *Eisenia foetida* al no provocar mortalidad ni signos tóxicos en las lombrices a la concentración de 10^8 conidios/ml.
2. El biopreparado Tricosave-34 no resultó tóxico para abejas *Apis mellifera* expuestas a la carga de 10^9 conidios/ml.
3. El biopreparado Tricosave-34 no demostró toxicidad para moluscos *Physa cubensis*.
4. El biopreparado Tricosave-34 no evidenció efectos tóxicos para peces *Poecilia reticulata*.
5. El Tricosave-34 no mostró evidencias significativas sobre la germinación y la elongación de la raíz en semillas de *Latuca sativa* que demuestren fitotoxicidad.

7. Recomendaciones

1. Continuar con las evaluaciones ecotoxicológicas del Tricosave-34 para su registro sanitario.
2. Profundizar en evaluaciones del Tricosave-34 en plantas para elucidar los resultados obtenidos sobre la germinación utilizando elevadas concentraciones de conidios.
3. Considerar en subsiguientes estudios la cuantificación de formas del hongo de los medios de ensayo y de muestras biológicas.

8. Referencias bibliográficas

1. 3Tac(wp) BIO-FUNGUICIDA. Centro de Documentación RitaChile. Avance Biotechnologies. Disponible en <http://www.avancebt.com/es/wp-content/uploads/2012/03/HDS-3-TAC-2012.pdf>. Consultado:20-05-2014
2. Al-Saleh I A. Pesticides: a review article. J Environ Pathol Toxicol Oncol 1994; 13:151-161.
3. APHA 1989. Standard methods for examination of water and wastewater. 720 p. 17th ed. American Public Health Association (APHA), Washington D. C., USA.
4. Argumedo-Delira, R., Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R.; Peña-Cabriales, J. El Género Fúngico *Trichoderma* y su Relación con Contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev. Int. Contam. Ambient. 25 (4) 257-269, 2009
5. Bagy, M. M., S. K. Hemida, et al. 1993. Terrestrial fungi inhabiting certain species of Nile fishes in Egypt. Zentralbl Mikrobiol 148(4): 289-97.
6. Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M.C., Codón, A. 2004 Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. International microbiology. Vol 7: 249-260.
7. Bioplaguicidas. Disponible en: <http://www.ecured.cu/index.php/Bioplaguicidas>. Consultado: 16-1-2014.
8. Borrero C, y Del Rosario, S. Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase iv del piedemonte llanero. Revista Orinoquia. Volumen N° 2 de 2005. Disponible en: http://orinoquia.unillanos.edu.co/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=265&Itemid=35. Consultado: 20-05-2014
9. Brian P.W. (1944). Production of gliotoxin by *Trichoderma viride*. Nature 154, 667-668.
10. Briggs SA, Rachel Carson Council. Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor & Francis publishers, 1992.
11. CENPALAB. Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales para experimentación en el CENPALAB. Edición 01/00. 2000.

12. Chouaki T, Lavarde V, Lachaud L, Raccurt CP, Hennequin C. 2013. Invasive Infections Due to *Trichoderma* Species: Report of 2 Cases, Findings of In Vitro Susceptibility Testing, and Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*. 35(11): 1360-1367.
13. Colin, I., *Microorganism and their application to bioassay testing en Handbook of Ecotoxicology*, 1993. editado por Peter Calow, Vol. I, Ed. Blackweel Scientific Publications, Gran Bretaña, pp. 315-330.
14. Di Pietro A., Lorito M., Hayes C.K., Broadway R. M. y Harman G.E. (1993). Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. *Phytopathology* 83, 308-313
15. Domsch, K., Anderson, W., Yersoon, T.H. 1980. *Compendium of Soil Fungi. Revision of the Genus Trichoderma*. Academic Press. London. 136-139, 794-810 pp.
16. Druzhinina I. y Kubicek C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea* : from aggregate species clusters? In : *Journal of Zhejiang University Science*.
17. Ecoosfera. 2014. Bioplaguicidas. Edit. River on Mirror. Disponible en: <http://www.ecoosfera.com/2013/02/bioplaguicidas-alternativa-a-los-pesticidas-convencionales>. Consultado: 16-1-2014
18. Eduard, W. 2009. "Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting." *Crit Rev Toxicol* 39(10): 799-864.
19. ELÓSEGUI, O. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de La Habana, Cuba. 2006.
20. EPPO. Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honey bees, Method 170, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 22, 203- 215. 1992.
21. Esposito E. y Da Silva M. (1998). Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 89-98.
22. Ezziyyani. M.; Sánchez, C. P.; Ahmed, A. S.; Requena, M.E. y Candela, M. E 2004 *Trichoderma Harzianum* Como Biofungicida Para El Biocontrol De *Phytophthora Capsici* En Plantas De Pimiento (*Capsicum Annuum* L.). España. *Anales de Biología* 26: 35-45.

23. Fait A. Colosio C. Recent advances and current concepts in pesticide hazards. En: Emmett EA, Frank AL, Gochfeld M, Hez SM, editores. The year book of occupational and environmental medicine. St. Louis: Mosby, 1998;15-29.
24. Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. En: Manejo integrado de Plagas (Costa Rica) No. 62. 96 – 100pp.
25. Fernández-Larrea, O. 2006. Los microorganismos en el control biológico. Alternativas de producción en Cuba. En: Memorias del Curso Internacional Manejo Agroecológico de Plagas en el Sistema de Producción. Ciudad Habana, Cuba.
26. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Roma: FAO, 1986; 28.
27. Fossi M. (1991) L'utilizzo dei "Biomarkers" nella valutazione del rischio ambientales. Metodologie e applicazioni. Inquinamento. 12: 44-49
28. Goldman LR. Linking research and policy to ensure children's environmental health. Environ Health Perspect 1998; 106: 857-862.
29. H González, L. Rodríguez, C. Arjona, A. Puertas y Ma. Fonseca Efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* R. sobre la composición cuantitativa de bacterias, hongos y actinomicetos de la rizofera de Solanaceas y su influencia en el crecimiento vegetativo. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg. Vol. 14 (1-2), 1999
30. Hajek AE, Goettel MS. Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms. En: Lacey LA, Kaya HK eds. Manual of Field Techniques in Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Netherland, 2000:847-868.
31. Hanson, E. Las desventajas de los bioplaguicidas. Disponible en: http://www.ehowenespanol.com/desventajas-bioplaguicidas-info_206997/ : Consultado 16-1-2014.
32. Hoja de Seguridad Funqui (*Trichoderma viride*). SinQuímica S.A. de CV. Disponible en: <http://www.quimia.com.mx/descargas/productos/funqui/FUNQUIhojadeseguridad.pdf>. Consultado: 20-05-2014.
33. HOJA DE SEGURIDAD Según Norma NCh2245 TRICHONATIVA® SC Suspensión Concentrada Bio Insumos Nativa Ltda. Disponible en: <http://www.bionativa.cl/wp->

content/uploads/2012/09/HOJA-DE-SEGURIDAD-TRICHONATIVA-n-2245-V1-2013.pdf.

Consultado: 20-05-2014

34. Hoja de Seguridad. AgroGuard®. 2003. Live Systems Technology S.A. LST S.A. Colombia. Disponible en: www.bam.com.co/admin_internas/hojas/LST/AGROGUARD.doc. Consultado: 20-05-2014
35. Hoja de Seguridad. Producto: TRICHOGEN WP. Yáser S.A.S. Disponible en: <http://www.yaserltda.com/doc/BIOLOGICOS/Hoja%20Seguridad%20TRICHOGEN.pdf>. Consultado 20-05-2014.
36. Hoja de Seguridad. TRICHOSIL® 50 WP (*Trichoderma harzianum* AP-001). Código: GS-SPS-RG-HS-95. Silvestre Portección Vegetal. Disponible en: http://www.silvestre.com.pe/site/imo:ages/Hojas_de_Seguridad/TRICHOSIL_50_WP-HS_APPLIEDCHEM.pdf. Consultado 20-05-2014.
37. Holford, N. H. & Sheiner, L. B. 1981. Ecuación de Emax sigmoidea. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. Clin Pharmacokinet, 6, 429-53.
38. Holloway, G., Croker, H., Callaghan, A., 1997. The effects of novel and stressful environments on trait distribution, Functional Ecology, 11:579-584.
39. Howell, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The history and Evolution of Current Concepts. In: Plant Disease Vol. 87 No. 1.
40. Iannacone, J., L. Alvarino, y W. Dale. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental. Boletín de Lima (Perú) 113:53-68.
41. Iannacone, J., y L. Alvarino. 1999. Ecotoxicidad aguda de metales pesados empleando juveniles del caracol de agua dulce *Physa venustula* (Gould, 1847) (*Mollusca*). Gayana 63:101-110.
42. Kacaniova, M., V. Knazovicka, et al. 2012. Microscopic fungi recovered from honey and their toxinogenicity. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 47(11): 1659-64.

43. Kleifeld O. y Chet I. (1992). *Trichoderma harzianum*-interaction with plants and effect on growth response. *Plant Soil* 144, 267-272.
44. Küçük, Ç. y Kivanç, M. 2003 Isolation of *Trichoderma spp.* and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features. In: *Turk J Biol*, 27, 247-253.
45. López CL. Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* N.o 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública, 1993.
46. Lorito, M. 2006 The molecular biology of the interactions between *Trichoderma*, phytopathogenic fungi and plants: oportunities for developing novel disease control methods En : *Memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol de fitopatógenos con Trichoderma y otros antagonistas*, 28-31 marzo, Ciudad de la Habana, Cuba, pp.1, ISBN 959-7194-03-1.
47. Martínez, L.C.C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *T. koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de diploma. *Microbiología Industrial*. Facultad de Ciencias .Bogotá, D, C.
48. Medina M. y Encina-Montoya, F. Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. *REVISTA AMBIENTE Y DESARROLLO de CIPMA*. VOL. XIX / N°s 3 y 4 / 2003
49. Melacon M. (1995) "Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring". En: *Handbook of Ecotoxicology*. Hoffman, D. B. Rattner, A. Burton y J. Cairns (Eds.) Lewis Publishers. 755 pp. Boca Raton. EE.UU.
50. Menzer, R., Lewis, M., Fairbrother., 1994. *Methods in environmental toxicology en Principles and methods of toxicology*, Hayes, W., 3era ed., Ed. Haven Press Ltd., New York, pp.1391-1418.
51. MINSAP. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004.
52. Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. In: *Int Microbiology* (2001) 4: 1-4.
53. Moses M. Pesticides. En: Paul M, editor. *Occupational and environmental reproductive hazards: a guide for clinicians*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993; 296-305.

54. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 1984. Fish, prolonged toxicity test: 14-day study. 204.
55. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 1992. Fish, acute toxicity test. 203.
56. OECD. 2001. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment, Number 33. Available from: <http://www.oecd.org>.
57. OECD. TG 207 "Earthworm acute toxicity test". Section 2 - Effect on biotic systems. OCDE Guidelines for Testing of Chemicals. 1984.
58. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS, 1993
59. Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, 9. Plaguicidas organoclorados. México: OMS/OPS, 1990.
60. Palmas del Espino. CONTROL BIOLÓGICO: EL USO DE BIOPLAGUICIDAS. Cultivando Desarrollo. Grupo Palmas. Disponible en: <http://www.palmas.com.pe/palmas/control-biologico-el-uso-de-bioplaguicidas> :Consultado 16-1-2014).
61. Peakall D. y L. Shugart (1992) Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health. NATO ASI Series H: Cell Biology, 68. 114 pp.
62. Peltola, J., A. Ritieni, et al. 2004. "Biological effects of Trichoderma harzianum peptaibols on mammalian cells." Appl Environ Microbiol 70(8): 4996-5004.
63. Pérez, L.M., Besoain, X., Reyes, M., Pardo, G., Montealegre, J. 2002. The expression of extracellular fungal cell wall hydrolytic enzymes in different Trichoderma harzianum isolates correlates with their ability to control Pyrenochaeta lycopersici. In: Biol Res 35: 401-410, 2002.
64. Pimentel D. 1998. Environmental and economic issues associated with pesticide use. p. 8-11. International Conference on Pesticide Use in Developing Countries: Impact on Health and Environment, Febrero 23-28. Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica.

65. Ranasingh, N., Saurabh, A., Nedunchezhiyan, M. 2006 Use of *Trichoderma* in Disease Management. In: Orissa Review pp.68-70.
66. Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernández-Galán, R., Collado, I.G. 2008 Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. In: *Phytochem Rev* 7:89-123.
67. Rodríguez Batista y Yohana Gato Cárdenas. 2010 Métodos alternativos en la conservación de *Trichoderma harzianum* Rifai. *Fitosanidad* v.14 n.4 Ciudad de la Habana
68. Romero, G; A. Crosara y Amalia Baraibar. *Trichoderma harzianum*: un biocontrol y biopromotor en vivero de especies forestales. 2006. Publicado en: Segundo Congreso Latinoamericano IUFRO (IUFROLAT 2006): Bosques creciente importancia sus funciones ambientales, sociales económicas, 23 al 27 de octubre de 2006, La Serena, Chile.
69. Sallenave, C; Pouchus, F. et al. 1999. Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment. *Toxicon* 37(1): 77-83.
70. Sisman, T., O. Gur, et al. 2012. Single-cell protein as an alternative food for zebrafish, *Danio rerio*: a toxicological assessment. *Toxicol Ind Health*
71. Sköt, M., 1995. Ecotoxicological testing, *Land contamination & reclamation*, 3 (4 special issue), 3-20.
72. Solfrizzo, M., C. Altomare, et al. 1994. "Detection of peptaibols and their hydrolysis products in cultures of *Trichoderma* species." *Nat Toxins* 2(6): 360-5.
73. Stefanova, M. 2007 Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma* spp. En Cuba. En: *Revista Fitosanidad* vol. 11, no.3, pp75-79. ISSN: 152-3009.
74. Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., Coronado, M. F. 1999. Actividad Metabólica de Cepas de *Trichoderma* spp. Para El Control De Hongos Fitopatógenos Del Suelo, *Rev. Fac. Agron. (Luz)* 16:509-516.
75. *Trichoderma harzianum*. Disponible en: http://www.ecured.cu/index.php/Trichoderma_harzianum. Consultado: 16-1-2014.

76. Truhaut R (1986) Ecotoxicology, a new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods and prospects. En: Hodgson E, Reviews on environmental toxicology. Use of laboratory models ecosystems for the evaluation of environmental contaminants. Elsevier Science Publishers B.D., Amsterdam.
77. U.S. EPA (h) OPPTS 885.4200. 1996. Freshwater fish testing, tier I.
78. U.S. EPA (i) OPPTS 850.1075. 1996. Fish Acute Toxicity Test, freshwater and marine.
79. US-EPA (a). Ecological Effect Test Guidelines. Honey Bee Acute Toxicity. OPPTS 850.3020. 1996.
80. US-EPA (b). Ecological Effect Test Guidelines. Honey Bee Toxicity of Residues on Foliage. OPPTS 850.3030. 1996.
81. US-EPA (c). Microbial Pesticides Test Guidelines. Honey bee Testing, Tier I. OPPTS 850.4380. February, 1996.
82. US-EPA (d). Microbial Pesticides Test Guidelines. Background for Microbial Pesticides Testing. OPPTS 885.5000. February, 1996.
83. US-EPA (e) OPPTS 885.0001, 1996 "Overview for Microbial Pest Control Agents"
84. US-EPA (f) OPPTS 885.4750, 1996 "Aquatic Ecosystem Test"
85. US-EPA (g) OPPTS 885.4240. 1996 "Freshwater Aquatic Invertebrate Testing, Tier I"
86. US-EPA (j) Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200, Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, 1996,
87. US-EPA (k) Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4100 Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence), 1996.
88. US-EPA, 1998. Risk Handbook, pp.1-30.
89. Wagner, C., Lockke, H., 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data, Wat. Res., 25:10:1237-1242.
90. Wang, W., Freemark, K., 1994. The use of plants for environmental monitoring and assessment, Env. Toxicol. Saf., 36:289-301.