

**EVALUACION DEL GRADO DE TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS MÁS  
UTILIZADOS EN EL MUNICIPIO DE POPAYAN MEDIANTE BIOENSAYOS CON  
*Bacillus subtilis* ATCC 6633.**

**DILBERT HARLEY VIVAS ZARATE  
ESTEBAN DAVID ROSERO HERNANDEZ**



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
POPAYÁN  
2008**

**EVALUACION DEL GRADO DE TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS MÁS  
UTILIZADOS EN EL MUNICIPIO DE POPAYAN MEDIANTE BIOENSAYOS CON  
*Bacillus subtilis* ATCC 6633.**

**DILBERT HARLEY VIVAS ZARATE  
ESTEBAN DAVID ROSERO HERNANDEZ**

**Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Biólogo.**

**Directora:**

**NEYLA BENÍTEZ CAMPO, M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
POPAYÁN  
2008**

**Nota de Aceptación:**

---

---

---

---

---

---

---

**Neyla Benitez Campo, M. Sc.**  
**Directora.**

---

**GERARDO NAUNDORF SAENZ M. Sc.**  
**Jurado.**

---

**SILVIO MARINO CARVAJAL, M.Sc.**  
**Jurado.**

**Fecha de sustentacion: 6 de Mayo de 2008**

**Popayán, Mayo de 2008.**

*A Dios, por habernos dado la Fe y fortaleza durante todo este arduo proceso e iluminarnos para culminarlo exitosamente.*

*A los miembros de la familia Vivas (Edgar, Eloisa, Claudia, Juliana, Ervin, José, Nicolás, July p.) y a la familia Rosero Hernández (Ernesto, Gladys, Camilo y Sebastian )*

*A la luz de todo ellos por el amor y la comprensión en el momento de apoyarnos para cumplir nuestras metas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Cauca, por habernos permitido ser parte de su valiosa cuna hacedora y forjadora del talento y conocimiento humano, a nuestros profesores y compañeros de clase por habernos compartido su sabiduría y valores.

A nuestra directora Neyla Benitez quien creyó en nosotros, por sus enseñanzas y sobre todo por su sensatez y don de gente; al personal del énfasis de Biología Celular y Molecular y su director Nelson Rojas por habernos abierto la puertas del laboratorio, a Jhon Meléndez por su colaboración en los servicios del laboratorio.

A los profesores Silvio Carvajal y Gerardo Naundorf por sus valiosos aportes y sugerencias para la elaboración de este trabajo.

A todos ellos muchas gracias por su colaboración y ayuda en nuestro proceso de formación.

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el grado de toxicidad de los plaguicidas más utilizados en el municipio de Popayán mediante bioensayos con *Bacillus subtilis*, basándose en estudios realizados en los últimos años que demuestran la capacidad de resistencia, por parte de algunos microorganismos, contra sustancias tóxicas que amenazan su entorno, así como también la capacidad de biodegradar estas sustancias en compuestos menos complejos, gracias a su potencial adaptativo y a las necesidades metabólicas propias.

Para realizar este proyecto, se llevó a cabo una fase inicial, en la cual se estandarizó el protocolo para el crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Posteriormente, se realizó el bioensayo mediante la técnica disco de sensibilidad, el cual consistió en analizar la toxicidad de los plaguicidas escogidos, según la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* sobre la superficie del cultivo en caja, el cual se observó por la formación de un halo translúcido alrededor de la zona de aplicación del plaguicida sobre un disco de papel filtro. Cada plaguicida se evaluó a diferentes concentraciones, por encima y por debajo de las dosis de aplicación recomendadas para uso agrícola. Para asegurar la solubilidad total de los plaguicidas se empleó una solución de DMSO-glicerol en proporciones definidas. Como control de referencia positivo se empleó Oxitetraciclina, un antibiótico de amplio espectro del grupo de las tetraciclinas, eficaz en este caso para las bacterias empleadas en el estudio.

Los resultados obtenidos en la prueba, mostraron que, la mayoría de los plaguicidas a sus diferentes concentraciones ejercen efectos tóxicos sobre *Bacillus subtilis*. El plaguicida con mayor toxicidad fue el Manzate cuyos diámetro de sus halos de inhibición (en mm) tuvieron un promedio de (14.069  $p= 0,00$ ) seguido del Curzate (12.86  $p=0.00$ ) y Format (11.637  $p= 0.00$ ) todos pertenecientes al grupo de los funguicidas. Seguidos por los herbicidas que presentaron resultados considerados como de mediana toxicidad Tordon (9.548  $p=0.00$ ), Gramoxone (9.375  $p=0.00$ ) y Roundup (8.99  $p=0.00$ ) frente al Combo cuya toxicidad fue nula. Mientras los insecticidas fueron los menos tóxicos, solo el Lorsban (7.744  $p=0.00$ ) presentó toxicidad frente al Taron y Furadan, los cuales no tuvieron ningún efecto sobre *B. subtilis*. En cuanto a las concentraciones empleadas, la mas alta (+1), fue la más tóxica (12,309  $p =0,00$ ) y la de menor concentración (-2) fue la menos toxica (9,212  $p= 0,00$ ). Por otra parte, se pudo demostrar la efectividad del bioensayo, como herramienta fiable en pruebas de toxicidad para plaguicidas.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, Biodegradación, Bioensayo, Biorremediación, Inhibición de crecimiento, Plaguicida, Toxicidad.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>11</b>
<b>1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>17</b>
2.1 DESCRIPCION GENERAL DE LOS PLAGUICIDAS.....	17
2.1.1 Efecto de los Plaguicidas en el Suelo y los Microorganismos.....	17
2.1.2 Procesos de Degradación de los Plaguicidas.....	18
2.1.3 Componentes Integrales de los Plaguicidas y su Implicación en el ambiente.....	21
2.1.4 Beneficios y Perjuicios del uso de Plaguicidas.....	22
2.2 PLAGUICIDAS EVALUADOS Y SUS PRINCIPALES CARACTERISTICAS.....	23
2.3 CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO UTILIZADO EN EL BIOENSAYO ( <i>Bacillus subtilis</i> ).....	25
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
3.1 SELECCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS Y PREPARACION DE LAS CONCENTRACIONES.....	26
3.2 PREPARACIÓN DEL BIOENSAYO.....	27
3.3 BIOENSAYO.....	29
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
3.4.1 Plan de Procesamiento y Análisis Estadístico.....	30

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1 PRUEBAS DE TOXICIDAD.....	32
<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Cantidad de plaguicidas registrados en el Instituto Colombiano Agropecuario ICA durante los años de 1974 y 2003.....	14
<b>Tabla 2.</b> Plaguicidas evaluados y sus principales características.....	24
<b>Tabla 3.</b> Lista de plaguicidas mas utilizados en el municipio de Popayán.....	26
<b>Tabla 4.</b> Lista de Plaguicidas las concentraciones utilizadas en el Bioensayo.....	28
<b>Tabla 5.</b> Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de los plaguicidas que causaron efecto toxico, según las concentraciones evaluadas .....	33
<b>Tabla 6.</b> Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de los plaguicidas que no causaron efecto toxico, según las concentraciones evaluadas .....	34
<b>Tabla 7.</b> <a href="#"><u>Porcentajes de efectividad toxica de cada uno de los plaguicidas frente al control positivo (Oxitetraciclina)</u></a> .....	42

## LISTA DE GRAFICOS.

	Pág.
<b>Grafica 1.</b> Cinética de los plaguicidas en plantas y en el medio ambiente.....	21
<b>Grafica 2.</b> Curva de crecimiento de <i>B. subtilis</i> . .....	29
<b>Grafica 3.</b> Esquema que ejemplifica el diseño experimental utilizado.....	31
<b>Grafica 4.</b> Diámetro promedio de los halos de inhibición producidos por los plaguicidas.....	34
<b>Grafica 5.</b> Fotografía de los halos de inhibición producidos por algunos de los Plaguicidas.....	35
<b>Grafica 6.</b> <a href="#">Correlaciones estadísticas de cada uno de los</a> plaguicidas.....	36
<b>Grafica 7.</b> Diámetro de los halos de inhibición vs. Concentraciones de los plaguicidas.....	41
<b>Grafica 8.</b> Estructura química de los plaguicidas.....	46
<b>Grafica 9.</b> Comparación toxicológica entre los diferentes grupos de plaguicidas empleados en el bioensayo.....	49

## INTRODUCCION

Los plaguicidas son sustancias químicas tóxicas, que se emplean para eliminar y controlar la proliferación de diferentes tipos de organismos, que afectan de manera adversa los cultivos y lugares habitados por el hombre.

Los plaguicidas, conocidos también como pesticidas o biocidas, han alcanzado un alto grado de eficiencia para controlar diferentes grupos de plagas, por ejemplo, la mayoría de los fungicidas de uso agrícola se fumigan o espolvorean sobre las semillas, hojas o frutas para impedir la propagación de la roya, el tizón, los mohos, etc. Además, los herbicidas, que representan casi la mitad del valor de todos los pesticidas utilizados, son empleados para eliminar, en las zonas de cultivo, las hierbas que compiten por el suelo y los nutrientes con las plantas cultivadas. El sistema de aspersión se hace directamente sobre la maleza. Otro grupo importante de plaguicidas son los insecticidas, los cuales ocupan el sector más pequeño del mercado mundial de los plaguicidas y representaron una inversión de unos 4,5 millones de dólares en 1993, lo que equivale a un 28% del total del mercado de los plaguicidas a nivel mundial, ([www.interplagas.com.ar/control-de-plagas.htm](http://www.interplagas.com.ar/control-de-plagas.htm)), estos se utilizan en la erradicación de insectos nocivos para los cultivos y la salud del hombre. Existen plaguicidas que son utilizados en bajas proporciones, entre ellos están los rodenticidas, acaricidas, nematocidas, moluscidas, entre otros.

Los plaguicidas tienen un efecto acumulativo en la naturaleza, conocido como [bioacumulación](#), debido a que presentan propiedades químicas que les confieren resistencia frente a los procesos de degradación ([www.sagan-gea.org/hojared\\_AGUA/paginas/11\\_aguab.html](http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/11_aguab.html)). Debido a esto, es importante implementar técnicas que contribuyan a la desnaturalización y eliminación del compuesto en el ambiente; es por ello que la biorremediación, definida como la utilización de organismos vivos en la eliminación de sustancias contaminantes para la recuperación de un ecosistema, se ha implementado como solución a dicho problema.

Los microorganismos son un elemento muy importante para llevar a cabo este proceso, debido a que transforman los compuestos complejos en simples, esto gracias a la diversidad metabólica que les ha permitido realizar procesos de biodegradación así como sus adaptaciones a nuevas sustancias contaminantes, lo que les permite ganar resistencia. Los microorganismos son también utilizados para realizar ensayos de toxicidad con distintas sustancias químicas que contaminan el ambiente.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se utilizó a *B. Subtilis* ATCC6636, un microorganismo típico del suelo con alto potencial como indicador en el ambiente del suelo, con el propósito de evaluar el grado de toxicidad de los plaguicidas usados con más frecuencia en el municipio de Popayán, así como también, determinar a que concentraciones estos fueron mas tóxicos. Se realizaron bioensayos con el microorganismo, lo que permitió determinar cual de los plaguicidas presento mayor índice de toxicidad, así como la concentración mas toxica, con respecto al crecimiento de *B. subtilis*. La cepa empleada en el estudio ya ha sido usada en otras investigaciones relacionadas con toxicidad obteniéndose buenos resultados (Martínez, M. Comunicado personal).

## 1. ANTECEDENTES

En los últimos años, a nivel mundial, se ha venido mostrando una creciente preocupación por el incremento en el uso de plaguicidas, lo que ha hecho que las organizaciones internacionales que se encargan de regular y controlar dichos insumos, hayan tenido que realizar variados estudios acerca de las implicaciones sobre el uso de los mismos; quizá uno de los organismos que más se ha venido mostrando interesado y se ha comprometido con el problema, ha sido la Organización Mundial de la Salud (OMS) la cual creó un ente especial llamado Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) el cual se encarga de vigilar y regular la utilización de plaguicidas en la producción de alimentos.

A nivel mundial el uso de plaguicidas se incrementó enormemente desde la década de los setentas hasta la década de los noventas. Durante estos veinte años, el mercado mundial de los agroquímicos se cuadruplicó, llegando casi a los 32 billones de dólares. Desde ese momento las ventas han disminuido en 12%, reportándose en el año 2002 ventas globales por 27,7 billones de dólares. Por región, en 2002 las ventas de agroquímicos en el oeste de Europa mostraron un incremento de 7,2% pero los mercados norteamericanos y el de la región Asia-Pacífico se redujeron en 1,7% y 1,8% respectivamente. Las ventas en América Latina experimentaron el más grande bajón de 3,8%. Las ventas de fungicidas se incrementaron en 2,7% mientras las de herbicidas e insecticidas se mantuvieron estables. Las ventas de herbicidas a nivel mundial constituyeron el mayor volumen con 46,6% del total del mercado.

En Colombia, Las formulaciones de plaguicidas registradas en el Instituto Colombiano Agropecuario ICA casi se han duplicado en los últimos treinta años, pasando de 770 productos en 1974 formulados con base en 186 ingredientes activos, a 1.370 en agosto de 2003, formulados con base en 400 ingredientes activos. Se sabe que al menos una quinta parte de estos ingredientes activos (77) se encuentran prohibidos o restringidos en otras partes del mundo por razones de salud y/o ambientales (NIVIA, 2007).

En la tabla 1, se muestra el incremento de los porcentajes del uso de plaguicidas en Colombia hasta el año de 2003, según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Tabla 1. Cantidad de plaguicidas registrados en el Instituto Colombiano Agropecuario ICA durante los años de 1974 y 2003

PRODUCTO	AÑO 1974	AÑO 2003
<b>Productos comerciales</b>	<b>770</b>	<b>1.370</b>
Químicos	767 (99.6%)	1.300 (95%)
Biológicos y naturales	3 (0.4%)	70 (5%)
<b>Ingredientes activos</b>	<b>186</b>	<b>400</b>
Químicos	184 (99%)	373 (94%)
Biológicos	2 (1%)	27 (6%)
<b>Clases de ingredientes activos</b>		
Insecticidas [i]	73 (39%)	133 (33%)
Herbicidas [ii]	57 (31%)	125 (31%)
Fungicidas [iii]	40 (21%)	106 (27%)
Coadyuvantes	11 (6%)	32 (8%)
Rodenticidas	5 (3%)	4 (1%)
<b>Clasificación por toxicidad aguda de los ingredientes activos [iv]</b>		
Extremadamente tóxicos (I)	41 (22%)	36 (9%)
Altamente tóxicos (II)		50 (13%)
Moderadamente tóxicos (III)	53 (28%)	210 (53%)
Ligeramente tóxicos (IV)	92 (50%)	90 (22%)
Sin categoría toxicológica		14 (3%)

(Nivia. 2007)

Entre 1980 y 1995 la producción de plaguicidas en Colombia se incrementó en 142%, pasando de 24.202 toneladas en 1980 a 34.352 toneladas en 1995. Durante el mismo período las ventas internas se incrementaron en 58%, pasando de 12.572 toneladas en 1980 a 19.806 toneladas en 1995. (NIVIA. 2007)

Actualmente, a casi la totalidad de plaguicidas que se encuentran en el mercado ya se les han realizado estudios de valoración de su categoría toxicológica, los cuales, en su mayoría, son llevados a cabo por los mismos laboratorios que los producen, quienes se preocupan más por fomentar los beneficios que se obtienen por la utilización de dichos pesticidas, que por mostrar el verdadero impacto que tienen a nivel de la salud humana y del medio ambiente en general. Los estudios se realizan utilizando parámetros como lo son LD50 (dosis letal 50) oral o percutánea, aplicados a animales como perros, aves, peces, conejos etc. Los cuales son también empleados en el hombre.

Por otra parte, se han realizado estudios del impacto de los plaguicidas sobre la actividad de los microorganismos del suelo, en los cuales se concluye que los pesticidas generan vectores de impacto multidireccional a los que hay que seguir para detectar los efectos. Dichos efectos influyen en los flujos energéticos organizados de los microorganismos, donde el reparto de trabajo está perfectamente equilibrado entre las diferentes poblaciones. Por eso, los plaguicidas se constituyen como un modo de perturbar esos equilibrios naturales y las modificaciones ocasionadas en las capas superficiales del suelo, alterando significativamente la composición de la comunidad microbiana y su potencial

bioquímico (Pozzo. et al. 2004). Es por ello que los microorganismos han venido cobrando mayor fuerza como parámetros de estudio para evaluar toxicidad en plaguicidas, prueba de ello es el desarrollo de el Test o ensayo de Ames, diseñado por Bruce Ames en 1975 (Bastidas y Gomez. 1999), el cual permite obtener, como resultado de la prueba, la capacidad mutagénica de un pesticida en el microorganismo.

En algunos departamentos de Colombia especialmente en el Huila, se han implementado este tipo de ensayos buscando evaluar el potencial mutagénico de aplicaciones simultáneas y de mezclas de plaguicidas (Bastidas y Gomez. 1999).

En cuanto a la degradación de los plaguicidas, ya se han establecido y evaluado gran parte de los factores ambientales que afectan dicho proceso (tales como: lixiviación, volatilización, adsorción, humedad, escurrimiento, pH, y temperatura), los cuales, dependiendo de su condición, pueden acelerar o disminuir la degradación del plaguicida, la cual puede ser desde unas pocas semanas o hasta de varios años. Uno de los factores más importantes que incide en la degradación de los plaguicidas, es aquel llevado a cabo por los microorganismos, los cuales, en los últimos años, se han visto como una posible solución a la problemática de la contaminación ambiental por diferentes sustancias químicas (desechos de fábricas, pesticidas, pinturas, fertilizantes etc.). Esto se ha demostrado mediante diferentes estudios, realizados en zonas de descarga de desechos de diferentes tipos de fábricas, aquí se encuentran varios tipos de microorganismos que tienen la capacidad de degradar los componentes químicos de estos residuos, que en su mayoría son tóxicos.

Es así como, las diferentes investigaciones a nivel ambiental y microbiológico han prestado atención a la biorremediación llevada a cabo por microorganismos. Se han realizado diversas investigaciones sobre el tema, encontrando que bacterias tales como *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) (Matus, et al 2003) y *Sphingopyxis chilensis* S37 (Godoy, et al 2003) poseen capacidad para degradar 2,4,6-Trichlorophenol, un compuesto producido de manera secundaria por la industria de la celulosa, utilizado para el blanqueamiento de madera y recientemente usado como un biocida y preservativo; además es considerado uno de los principales contaminantes en las zonas de descarga en afluentes, porque es demasiado tóxico, persistente y bioacumulable.

Se han realizado pruebas en las cuales el genero *Bacillus* es utilizado en bioensayos y se han obtenido resultados rápidos y confiables para determinar toxicidad en aguas contaminadas por químicos solubles e insolubles (LIU, D. et al1991). Otro tipo de pruebas han sido realizadas con respecto al aislamiento de ciertos microorganismos presentes en las zonas de efluentes de descargas de desechos industriales, por ejemplo, se han encontrado y aislado *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, entre otros. Los microorganismos mencionados presentaron características que las hacían resistentes a clorofenoles

como el 2,4- dichlorofenol (DCP), 2,4,6-trichlorophenol y pentachloropheol (PCP) (Martínez, M. et. al 2000).

En lo que respecta a los plaguicidas a usar en este proyecto, se ha podido constatar, que los más estudiados con fines de procesos de biodegradación, han sido entre otros: clorpirifox, carbofuran, paraquat y el popular glifosato, para los cuales el factor de biodegradación es muy importante para su eliminación del ambiente.

Para el caso de Colombia, varios de los estudios se han centrado principalmente en el glifosato, ya que este ha sido elemento clave en la erradicación de los cultivos ilícitos, usándose tan solo para ese fin entre el 10% y 14% del total del glifosato usado en Colombia (Solomon, et. al. 2005). Debido a que las áreas de siembra de estos cultivos son demasiado extensas, el gobierno ha utilizado sistemas de aspersión aérea para las fumigaciones permitiendo que este caiga indiscriminadamente sobre cualquier otro tipo de vegetación, u forma de vida presente en la zona, incluyendo al hombre (Solomon, et. al 2005).

Esto ha generado una variedad de problemas que las comunidades afectadas han denunciado, desde contaminación de fuentes de agua hasta intoxicación y otros problemas de salud (irritaciones y salpullidos tanto dérmicos como oftálmicos), sin mencionar las pérdidas económicas que se presentan en la zona por las fumigaciones con glifosato (Uribe, et al 2001). Debido a esto, el gobierno nacional ha procurado llevar a cabo estudios del impacto del glifosato en el ambiente y de los individuos que habitan en el, como por ejemplo genotoxicidad, biodegradación, toxicidad, bioacumulación, entre otros.

En el departamento del Cauca se ha realizado un estudio que evalúa los efectos citotóxicos/genotóxicos del Roundup (Glifosato) en ratones, el cual muestra que este herbicida induce efecto letal dominante en células germinales y células somáticas (Chicangana y Uribe 2006).

En investigaciones llevadas a cabo en meristemos radicales expuestos al pesticida Furadan, se encontró que este produce alteraciones toxicas visibles en las raíces, además de efectos citotóxicos y genotóxicos (Candela 2005). En general en el Cauca son muy pocos los estudios realizados sobre los pesticidas en cuanto a su toxicidad e impacto sobre las tierras de cultivo expuestas y mucho menos estudios que den solución a esta problemática.



## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS PLAGUICIDAS

Los plaguicidas han sido diseñados primaria y específicamente para combatir a organismos vivos conocidos por causar efectos no deseados y dañinos sobre cultivos agrícolas y forestales. Los plaguicidas, por lo tanto, son sustancias que permiten:

- Combatir agentes nocivos para las plantas y sus productos ó prevenir su acción.
- Favorecen y/o regulan la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la recuperación de suelos.
- Conservan los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.
- Destruyen plantas indeseables.
- Destruyen parte de las plantas y/o previenen un crecimiento indeseable de las mismas.
- Hacen inofensivas las plagas, además destruyen y/o previenen la acción de otros organismos nocivos o indeseables ([www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_143.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_143.htm)).

Evidentemente la actividad del plaguicida sobre la especie objetivo no es considerado un problema, ya que en esa actividad se basa su eficacia y la razón de su utilización, sin embargo los [problemas](#) se presentan debido a la falta de selectividad ya que en la liberación de estas sustancias la toxicidad se extiende a otras especies no objetivos. Este posible efecto no intencionado sobre otros organismos, obliga a realizar valoraciones previas a modo de minimizar los impactos sobre estos organismos y los diferentes compartimentos ambientales (agua, suelo, etc.)(Enríquez. 1997).

#### 2.1.1 Efecto de los plaguicidas en el suelo y los microorganismos

Uno de los mayores afectados por la utilización de los plaguicidas es el suelo, ya que éste, lejos de ser inerte, constituye un medio con características particulares en el que conviven bacterias, hongos, algas, actinomicetos, virus, además organismos superiores. Es un lugar donde las interacciones biológicas son muy intensas y donde ocurren procesos bioquímicos vinculados con la degradación de la materia orgánica, la disponibilidad de nutrientes para las plantas y la

transformación de los elementos minerales, entre otros. Pese a lo complejo de estos acontecimientos, la evolución del hábitat ha logrado que los microorganismos generen flujos energéticos organizados, donde el reparto de trabajo está perfectamente equilibrado entre las diferentes poblaciones. (Pozzo, et. al 2004).

Las actividades agropecuarias constituyen un modo de alteración del equilibrio natural y hace que ocurran modificaciones en las capas superficiales del suelo que alteran significativamente la composición de la comunidad microbiana y su potencial bioquímico. Un ejemplo de ello, son las masivas y reiteradas aplicaciones de agroquímicos y la persistencia de algunos de ellos, al quedar retenidos en las partículas del suelo como residuos o productos estables. Frente a esto, los microorganismos tienen un potencial genético excepcional que les permite tolerar y reacomodar su composición poblacional mediante estrategias como la selección intra e íter específica, las mutaciones, la activación de genes bloqueados, etc. (Pozzo, et al. 2004).

Lo cierto es que cuando una población se ve afectada y su capacidad de competencia disminuye, aparecen rápidamente otras formas de vida que la sustituyen espacialmente. Muchas veces, este reemplazo significa la interrupción de alguna sucesión metabólica que desencadena posteriores cambios en la composición poblacional. Estas posibles alteraciones deben ser tenidas en cuenta cuando se planifica algún cambio tecnológico en el manejo de los cultivos pues dichas perturbaciones representan una de las formas modernas de erosionar los suelos. El hecho de que un suelo agrícola posea una importante actividad microbiana, presupone pero no garantiza el cumplimiento de los ciclos energéticos esenciales para la vida. (Pozzo. et al. 2004).

### **2.1.2 Procesos de degradación de los plaguicidas**

Independientemente de cómo o cual haya sido el motivo de la aplicación del plaguicida en el ambiente, su concentración en el medio va variando debido a los procesos de dispersión, volatilización, lixiviación y degradación química y biológica. La medida con que se producen todos estos procesos depende en gran parte de las características físico-químicas de cada compuesto y también de las propiedades de las aguas y del suelo, así como las condiciones ambientales de las zonas y del método de aplicación. A continuación se describen estos procesos y factores asociados a los plaguicidas.

- **Volatilización:**

Es una [propiedad](#) considerada como la que más afecta el movimiento del plaguicida hacia la [atm](#)ósfera después de la aplicación, esta es determinada por la

tensión de vapor del plaguicida. Los plaguicidas normalmente tienen tensiones de vapor relativamente bajas ( $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  mm Hg), como también hay algunos que son muy volátiles y precisamente deben a ello gran parte de su eficacia al actuar por inhalación y penetrar vaporizado en lugares como el interior de un racimo de uvas. La volatilización es aumentada por el viento y la temperatura. Un mismo plaguicida, con distinta formulación, tiene diferentes presiones de vapor y por ende su grado de volatilización es distinto.

- **Lixiviación:**

La lixiviación es el fenómeno por el cual un plaguicida se desplaza hacia el interior del [suelo](#), pero fuera de su área objetivo causando en algunos casos la contaminación de las capas subterráneas dependiendo de la profundidad de esta y de la movilidad del plaguicida. La lixiviación es un proceso que depende de las características químicas del plaguicida y las propiedades físico-químicas del suelo.

De manera general, se entiende que esta capacidad de los plaguicidas viene definida con un parámetro de interés ambiental denominado índice GUS que se expresa como el cociente entre la vida media (tiempo necesario para reducir a la mitad la concentración de un determinado compuesto  $t_{1/2}$ ) y el Log  $K_{ow}$  (coeficiente octanol-agua).

$K_{ow}$ , es definido como la relación de concentraciones de un compuesto entre el octanol y el agua, como un indicador del grado de hidrofobicidad de cada compuesto, lo que nos muestra la capacidad para acumularse en los organismos vivos y su potencial de absorción sobre la materia orgánica de los suelos. Se dice que cuando un compuesto tiene un  $K_{ow}$  elevado, tiene un potencial de bioacumulación muy alto, y por lo tanto es transferible a lo largo de las cadenas tróficas.

En suelos se utiliza el coeficiente de reparto,  $KD$ , como un indicador del grado de atracción y retención de los pesticidas en la superficie de las partículas del suelo. La retención depende básicamente del tipo de suelo. Esta retención hace que el compuesto no sea biodisponible pero disminuye la probabilidad de biodegradación. (Ruiz, 2001)

- **Escurrecimiento:**

Se produce en zonas de aplicación del plaguicida cercanas a aguas superficiales donde se producen los escurrecimientos, y contaminan las aguas con los plaguicidas. Por esto, factores como el riego, lluvias y efectos de deriva son las causas principales de esta situación.

- **Adsorción:**

La adsorción de los plaguicidas en el suelo, es medida por el coeficiente de adsorción del producto ( $K_d$ ), y según las características de este será el grado de adsorción y por lo tanto de inmovilidad del plaguicida. Según el tipo de suelo, la adsorción cambia cuando:

- ✓ Aumenta el % de materia orgánica, hay aumento de la adsorción
- ✓ Aumenta el % de arcilla, hay aumento de la adsorción
- ✓ Aumenta el % de arena, hay disminución de la adsorción

De igual manera, los plaguicidas más solubles en agua tendrán mayor nivel de movilidad respecto a los menos solubles.

- **Humedad:**

Cuando hay aumento de la humedad del suelo, implica a que haya, en la mayoría de los casos, un aumento de la sustancia disuelta y por ende mayor desplazamiento de ellas hacia los estratos más profundos del suelo.

- **pH:**

En los suelos agrícolas el pH de los suelos varía entre 6 y 9, pero puede llegar a valores de 3 en suelos boscosos. La constante de adsorción varía con el pH, siendo baja cuando el pH es muy alto o muy bajo, con lo que aumenta la liberación del plaguicida en el suelo.

- **Temperatura:**

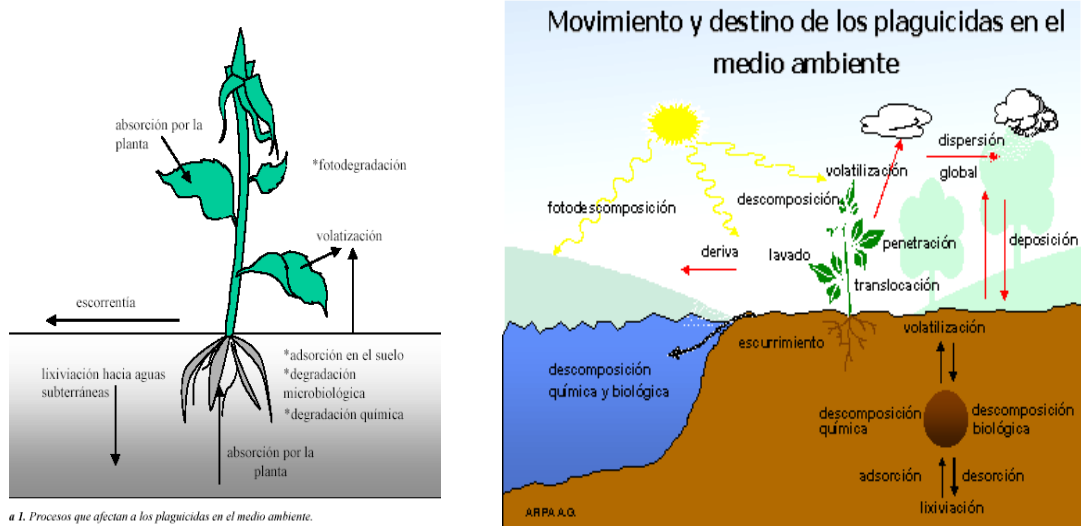
La temperatura influye acelerando los procesos en la mayoría de los factores de degradación anteriormente mencionados. (Instituto Nacional de Ecología, Mexico. 2007)

En la figura 1, se presenta un esquema en el cual se aprecia la cinética de los plaguicidas en las plantas y en el ambiente, según los anteriores parámetros. Cuando hay una aspersión del plaguicida directa sobre la planta (Grafica. 1-a), hay una absorción directa por medio del área foliar y sus raíces. Otro efecto directo observado es la volatilización que puede darse desde la planta o desde el suelo y es dado por las propiedades del plaguicida y el ambiente; así como también la fotodegradación llevada a cabo por la luz solar.

Cuando el plaguicida actúa también con otros elementos del ambiente como el agua o el suelo (Grafica 1-b), se observan los procesos por los cuales estos interactúan sobre el medio. Cuando un plaguicida es esparcido en el ambiente,

llega a dos lugares iniciales, el aire y el suelo, en el primero por medio de la volatilización y en el segundo por medio de la lixiviación, en donde habrá una descomposición tanto química como biológica. Un efecto importante a considerar durante este proceso es la escorrentía, por medio de la cual el plaguicida llega hasta los afluentes más cercanos, en donde estos también sufren descomposición. Durante todo el recorrido, ocurren procesos como: la fotodescomposición, evaporización y volatilización de dichos componentes, de manera tal, que posteriormente habrá una dispersión global de los mismos por medio de las aguas lluvias.

**Grafica 1.** a) Cinética de los plaguicidas en las plantas, b) Cinética de los plaguicidas en el medio ambiente



a 1. Procesos que afectan a los plaguicidas en el medio ambiente.

(Enriquez, 1997)

### 2.1.3 Componentes Integrales de los Plaguicidas y sus Implicaciones en el Ambiente

Los plaguicidas no siempre actúan únicamente con su ingrediente activo sino también los componentes que hacen parte del producto. Estos pueden tener características muy tóxicas pese a su baja concentración. El siguiente tipo de componentes son los que integran a un plaguicida:

- **Ingrediente Activo.**

Dependiendo de su finalidad e interés, esta presente en todos los productos con determinada actividad plaguicida con un grado de pureza establecido.

- **Ingredientes Inertes.**

Son sustancias ligadas al ingrediente activo, y son importantes para la preparación de formulaciones. Además permiten modificar sus características de dosificación o de aplicación.

- **Coadyuvantes.**

Utilizados por su capacidad de modificar adecuadamente las propiedades físicas y químicas de los ingredientes activos. Estos pueden ser: tensoactivos, fluidificantes, estabilizantes y demás.

- **Aditivos.**

No tienen influencia en la efectividad de los plaguicidas; utilizados en la elaboración de los mismos para cumplir prescripciones reglamentarias u otras finalidades.

#### **2.1.4 Beneficios y Perjuicios del uso de Plaguicidas.**

Cabe mencionar que los plaguicidas han sido de gran ayuda en la producción alimenticia, y además con la demanda creciente de alimentos para atender a una población humana que se multiplica rápidamente los plaguicidas han reportado beneficios innegables. Entre otros aspectos, han sido colaboradores en el mantenimiento de la salud humana, ya que han sido útiles en el control de plagas, como el mosquito *Anopheles* o al *Aedes*, que son transmisores del paludismo.

La lista de beneficios es bastante significativa, sin embargo hay muchos contras que se desatan del uso excesivo de estos en el ambiente, por ejemplo:

El **primer** aspecto no considerado frecuentemente, es que al utilizar estos compuestos se pueden matar muchos organismos que no se desean erradicar. El **segundo** aspecto a considerar, es que el producto que se haya aplicado en repetidas ocasiones, tiende a crear resistencia y fortaleza de la especie que se quiere erradicar, dificultando y haciendo ineficaces a los productos aplicados.

Un **tercer** aspecto se desencadenaría a raíz del anterior, y es que el plaguicida al ser ineficaz, las personas utilizan cantidades mucho más altas que las recomendadas aumentando los efectos contaminantes del mismo.

En **cuarta** instancia, puede inducir al exterminio de los enemigos naturales del organismo que se quiere erradicar; por ende hay desequilibrio del ecosistema, ya que se esta eliminando el único vector natural capaz de exterminar la plaga.

En **quinto** lugar, infiere en los enemigos naturales de las plagas, debido a que son encontrados en menor proporción y además que sometidos a plaguicidas, en estas condiciones son condenados a desaparecer rápidamente.

El **sexto** aspecto a considerar es la estabilidad del plaguicida, a mayor estabilidad mayor eficiencia. El problema radica, en que los plaguicidas más estables no se degradan ni rápida ni fácilmente, lo que induce su permanencia en el ambiente por mucho mas tiempo dando lugar a que haya efectos nocivos a largo plazo.

[www.sagan-gea.org/hojared\\_AGUA/paginas/11aguab.html](http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/11aguab.html)

## **2.2 PLAGUICIDAS EVALUADOS Y SUS PRINCIPALES CARACTERISTICAS.**

Los plaguicidas se seleccionaron mediante la realización de encuestas en algunas de las mas importantes casas agrícolas de la ciudad de Popayán (MultiAgro, SuperAgro, Agro insumos del Cauca, Deposito Norte, SurtiAgro, ProAgro). Estos se seleccionaron de acuerdo al posicionamiento en ventas en cada una de las casas agrícolas. Posterior a ello se compararon los resultados para determinar así los plaguicidas con mayor frecuencia de ventas ( $\geq 3$ ).

A continuación, en la Tabla 2, se nombran y se describen los plaguicidas utilizados en el presente estudio, así como sus características más representativas tales como: ingrediente activo, nombre común, nombre químico, propiedades, usos, toxicología, y análisis del producto y sus residuos (WORTHING. et. al. 1987).

**Tabla 2.** Plaguicidas evaluados y sus principales características.

PLAGUICIDA	NOMBRE COMUN	NOMBRE QUIMICO	USOS	TOXICOLOGIA LD50	ANÁLISIS PRODUCTO Y RESIDUOS
ROUNDUP	Glifosato (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P)	Sal isopropilamina de N(fosfonometil)glicina	Herbicida no selectivo. Elimina raíces profundas de plantas perennes anuales y bianuales	Ratas: 5000mg a.i./Kg	HPLC.
FURADAN 3SC	Carbofuran (C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub> )	2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metil-carbonato	Insecticida Acaricida sistémico y nematicida. Aplicación a suelo y follaje.	O. Ratonés: 8-14mg a.i./Kg. O. Perros: 19 mg a.i./Kg	Producto: HPLC o cromatografía infrarroja. Residuos: HPLC.
MANZATE 200WP	Mancozeb [SCS.NHC <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHCS. S.Mn-] X(Zn)Y	Manganeso etilenebis (ditiocarbamato)(polimerico) compuesto con sal de zinc.	Fungicida protector contra un alto rango de enfermedades fungosas foliares.	O. Ratas: 8000 mg a.i./Kg O. Pez rojo: 40 mg a.i./Kg Ingestión diaria humana aceptable ADI: 0.05 mg/Kg	Descomposición con ácido y midiendo el carbón bisulfuro liberado
GRAMOXONE SL	Paraquat (C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> )	1,1-dimetil-4,4-bipiridilo	Herbicida. Destruye por simple contacto.	O. Ratas: 150mg/Kg O. Perros: 25-50mg/Kg	Colorimetría después de la reducción.
TORDON	Picloram + 2,4-D C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4-amino-3,5,6-tricloro-2-acido tricloropicdínico de sal trisopropanolamina.	Herbicida. Produce epinastacia, y caída de los ensortijamientos. Acumulable en los nuevos brotes.	O. ratas: 8200mg/Kg. Conejos: 4000mg/Kg. Relativamente no toxico para abejas melíferas.	Cromatografía de gas liquida o por HPLC, tanto de productos como de residuos.
COMBO	Picloram + Metsulfuron metil C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4-amino-3,5,6-tricloropicolinico	Herbicida. Produce epinastacia, y caída de los ensortijamientos. Acumulable en los nuevos brotes.	O. ratas: 8200mg/Kg. Conejos: 4000mg/Kg. Relativamente no toxico para abejas melíferas.	Cromatografía de gas liquida o por HPLC, tanto de productos como de residuos.
TAMARON SL 600	Methamidophos C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>2</sub> PS	O,S-dimetil fosforamidotioato	Insecticida. Acaricida e insecticida. Sistémico al ser aplicado en troncos percederos.	O. Ratas: 30mg/Kg. Conejos : 10- 30mg/Kg. Hombre (ADI): 0.0006mg/Kg.	Producto: Espectrofotometría infrarroja o cromatografía de gas liquido. Residuos: cromatografía de gas liquido con FID.
LORSBAN 4 EC	Chlorpyrifos C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> C <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> PS	O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-pyridyl fosforotioato.	Insecticida. Efectivo por contacto, ingestión y acción del vapor. Para plagas voladoras domesticas y mosquitos.	O. Ratas: 135 -163 mg/Kg. Conejos: 2000 mg/Kg.	Producto: HPLC con U.V Residuos: cromatografía de gas liquido.
FORMAT 70 WP	Propineb C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Zn	Polimeric zinc Propilenebis (ditiocarbomato)	Fungicida. De protección, gran actividad residual	O. ratas: 8500mg/Kg. Inofensivo para abejas melíferas.	Producto: Titulación con yodo, seguido de hidrólisis y carbón bisulfato liberado. Residuos: Colorimetría del complejo con el carbón bisulfato.
CURZATE M-8	Cymoxanil y Mancozeb C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2-ciano-N-(etilaminoacetil)-2-(metoxiimino) acetamida (Cymoxanil) Producto iónico de coordinacion de Zinc y etilenbisditiocarbamato de manganeso (Mancozeb)	Fungicida. Acción sistémica local.	O. Ratas: 1196mg/Kg. O. Conejos: 3000 mg/Kg.	Producto: HPLC con detección U.V Residuos: cromatografía de gas liquido.



### **2.3 CARACTERÍSTICAS DEL MICROORGANISMO UTILIZADO EN EL BIOENSAYO (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)**

Son bacilos alargados y rectos, de 0.5-2.5 x 1.2-10  $\mu\text{m}$  agrupados en pares de cadenas con terminaciones redondeadas. Las células presentan una coloración Gram positiva y tienen movilidad por flagelos peritricos.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633, realiza una fermentación 2,3 butanodiólica, cuyos productos principales son butanodiol, etanol,  $\text{CO}_2$ , y  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos microorganismos también producen glicerol como un producto de la fermentación.

Son bacterias Gram positivas, mesófilas, no son potencialmente patógenas (Holt. et al. 1994), no producen endotoxinas y secreta proteínas hacia el medio. Presentan un buen crecimiento en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc. como las únicas fuentes de carbono y el amonio como única fuente de nitrógeno (Bioland, 2007) .

Son aeróbicos facultativos. Se encuentran en un amplio rango de hábitats y son uno de los más representativos del suelo (Holt. et al. 1994).

Producen endosporas termoresistentes, de forma oval, las cuales resisten a la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos.

Producen o secretan sustancias antimicrobianas, como la Subtilina, un tipo de Lantibiótico peptídico sintetizado ribosomalmente, el cual actúa contra bacterias Gram positivas, y proporciona protección contra las condiciones adversas en el medio ambiente (Heinzmann. et al. 2006). La producción de este antibiótico ha sido muy estudiada en la cepa ATCC 6633, en la cual se han podido determinar los genes específicos involucrados en este proceso, dichos genes son: Spa B, Spa T, Spa C. ( Stein, 2005)

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 SELECCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS Y PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES.

Para determinar los plaguicidas a utilizar en el bioensayo, se realizaron encuestas en algunas de las casas agrícolas más importantes de la ciudad de Popayán, estas registran a su vez los mayores índices de ventas en insumos agrícolas. En la Tabla 3, se muestran los plaguicidas más utilizados según la frecuencia de ventas.

**Tabla 3.** Lista de plaguicidas mas utilizados en el municipio de Popayán

<b>HERBICIDAS</b>	<b>FRECUENCIA DE VENTA</b>
<b>Roundup (Glifosato)</b>	<b>6</b>
<b>Gramoxone SL</b>	<b>4</b>
<b>Tordon (Picloram)</b>	<b>3</b>
Rocket	1
<b>Combo( Picloram-helechos)</b>	<b>3</b>
2-4-D	1
Afalon (Linuron)	1
<b>INSECTICIDAS</b>	
<b>Furadán (Carbofurán)</b>	<b>3</b>
<b>Tamaron (Metamidophos)</b>	<b>3</b>
Malathion (malathion)	1
<b>Lorsban (Chlorpyrifos)</b>	<b>4</b>
Cyromazina	1
Deltametrina	1
Profenofos	2
Permetrina	2
Carbosulfan	2
Cypermetrina	1
<b>FUNGICIDAS</b>	
<b>Manzate (Mancozeb)</b>	<b>6</b>
<b>Curzate (Cymoxanil)</b>	<b>5</b>
Fosetal De Aluminio	2
<b>Format (Propineb)</b>	<b>3</b>
Benomyl	1
Oxicloruro De Cobre	2
Carbendazim	1
Carboxin (semillas)	1
Azufre 7-20 (roya)	1
Benalaxyl	1
1 Sandofan	1

Los plaguicidas seleccionados fueron los que mostraron una incidencia de venta  $\geq 3$  (numero de repeticiones del nivel en ventas que ocupaba un plaguicida) en las siguientes agropecuarias consultadas: MultiAgro, SuperAgro, Agro insumos del Cauca, Deposito Norte, SurtiAgro, ProAgro. La calificación representa el número de repeticiones obtenidas en las seis casas agrícolas.

Una vez seleccionados los plaguicidas a evaluar, se procedió a establecer las concentraciones para su utilización en el bioensayo, estas se muestran en la Tabla 4 y se fijaron de acuerdo a las recomendaciones de preparación indicadas en las casas agrícolas y en las etiquetas de los productos, esto con el fin de hacer el experimento lo mas cercano posible a la aplicación real de estos productos. Posteriormente se calcularon las respectivas cantidades para su utilización a pequeña escala de la siguiente manera:

Primero se preparó la concentración recomendada (denotada también como *concentración normal, N*), luego se prepararon tres diluciones más de cada plaguicida a diferentes concentraciones, así: Una concentración superior a la recomendada (+1) y dos por debajo de la misma (-1 y -2 respectivamente). Cada uno de los plaguicidas se disolvió en una solución de Dimetil Sulfoxido (DMSO) y Glicerol en relación 70 – 30 (D. Liu. et. al. 1991), con el propósito de garantizar que las soluciones sean homogéneas.

Posterior a la preparación de los pesticidas, estos se almacenaron, de uno a dos días, a 4°C para prevenir la desnaturalización de sus componentes. Paralelamente, se esterilizaron discos de papel filtro de aproximadamente 5 cm de diámetro, de las siguientes características: Papel filtro Wathman tipo 1, cuyo tamaño de poro es de 11µm, composición: celulosa y un tipo de resina inerte que corresponde a uno de los papeles filtro mas ampliamente utilizados en este tipo de pruebas.

### **3.2 PREPARACIÓN DEL BIOENSAYO.**

El bioensayo se realizó a partir de las esporas de *Bacillus subtilis* liofilizadas contenidas en una membrana (donación: Miguel Martínez. Universidad de Concepción. Chile). Inicialmente se realizó una prueba de viabilidad la cual consistió en tomar una porción de 1 cm<sup>2</sup> de las esporas, contenidas en papel, las cuales fueron inoculadas en 100 mL de medio de cultivo líquido (Glucosa 1.0 g/L, CH<sub>3</sub>COONa 1.0 g/L, Caldo nutritivo 1.0 g/L, Extracto de levadura 1.0 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8g/L) y se incubó 130 rpm a 35°C por 12 horas.

**Tabla 4.** Lista de Plaguicidas y las concentraciones utilizadas en el Bioensayo.

PESTICIDA (+INGREDIENTE ACTIVO)	Tipo de plaguicida	Cantidades recomendadas para uso agrícola	Concentraciones utilizadas			
			+1	N	-1	-2
<b>ROUNDUP</b> (Glifosato)	Herbicida	5 mL/L	7.5mL/L	5mL/L	2.5mL/L	1.25mL/L
<b>GRAMOXONE SL</b> (Paraquat)	Herbicida	1.5 mL/L	2.25 mL/L	1.5 mL/L	0.75 mL/L	0.375 mL/L
<b>TORDON 101 SL</b> (Picloram + 2,4-D)	Herbicida	6 mL/L	9 mL/L	6 mL/L	3 mL/L	1.5 mL/L
<b>COMBO</b> (Picloram+Metsulfuron)	Herbicida	12.5 g/L	18.75g/L	12.5g/L	6.25g/L	3.125g/L
<b>FURADAN 3SC</b> (Carbofurán)	Insecticida	1 mL/L	1.5 mL/L	1mL/L	0.5 mL/L	0.25 mL/L
<b>TAMARON SL600</b> (Metamidofos)	Insecticida	1.25 mL/L	1.875 mL/L	1.25 mL/L	0.625 mL/L	0.312 mL/L
<b>LORSBAN 4EC</b> (Clorpirifos)	Insecticida	1.25 mL/L	1.87 mL/L	1.25 mL/L	0.625 mL/L	0.312 mL/L
<b>MANZATE 200WP</b> (Mancozeb)	Fungicida	5 g/L	7.5g/L	5g/L	2.5g/L	1.25g/L
<b>CURZATE M-8</b> (Cymoxanil + Mancozeb)	Fungicida	2.5 g/L	3.75 g/L	2.5g/L	1.25g/L	0.625g/L
<b>FORMAT 70WP</b> (Propineb)	Fungicida	2 g/L	3g/L	2g/L	1g/L	0.5g/L

Posteriormente se estableció la curva de crecimiento del microorganismo para determinar el tiempo al cual se alcanza el punto máximo de la fase exponencial. Ver grafica 2.

**Grafica 2. Curva de crecimiento de *B. subtilis*.** Se observa que a las 6 horas de crecimiento se obtuvo el número máximo de células que corresponde a una población de  $2 \times 10^6$  cel / mL. El número de células se estimó mediante conteo en cámara de Neubauer y espectrofotometría.



En este punto de la fase exponencial se tomaron e inocularon 0.5mL que contenían aproximadamente  $2,1 \times 10^6$  cel/mL de *B. subtilis* sobre una caja de Petri con el medio de cultivo anteriormente mencionado y adicionando agar-agar (15g/L) para su solidificación (previamente secados a  $30^\circ\text{C}$  x 8 horas) , y cuya densidad óptica fue de 0.4, ya que a esta densidad óptica el microorganismo presentó su punto máximo de crecimiento, dentro de la fase exponencial, determinada a una longitud de onda de 620 nm (D. Liu et al. 1991).

### 3.3 BIOENSAYO.

En cada una de las cajas inoculadas con *B. subtilis* se ubicaron 4 discos de papel filtro, en los cuales, se aplicaron  $7\mu\text{L}$  de los plaguicidas a las diferentes concentraciones seleccionadas (ver tabla 4); Paralelamente, y en otra caja, se ubicaron dos discos, los cuales se emplearon como controles. El negativo, compuesto por el solvente Dimetilsulfoxido+Glicerol (DMSO+Glicerol) y el control

positivo compuesto por Oxitetraciclina más el solvente (Gesche, et al. 2001). Las cajas se incubaron a 35°C por 18 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la toxicidad de cada plaguicida al medir el tamaño de los halos de inhibición alrededor de cada disco con plaguicida. En la gráfica 3, se observa un esquema del montaje experimental, además de la ubicación de los discos en las cajas. Los anteriores procedimientos se realizaron en cada una de las cuatro repeticiones ejecutadas. Debido a la disposición de material con el que se contaba, se implemento un diseño experimental que se ajustara a ello, para lo cual fue necesario realizar las cuatro repeticiones.

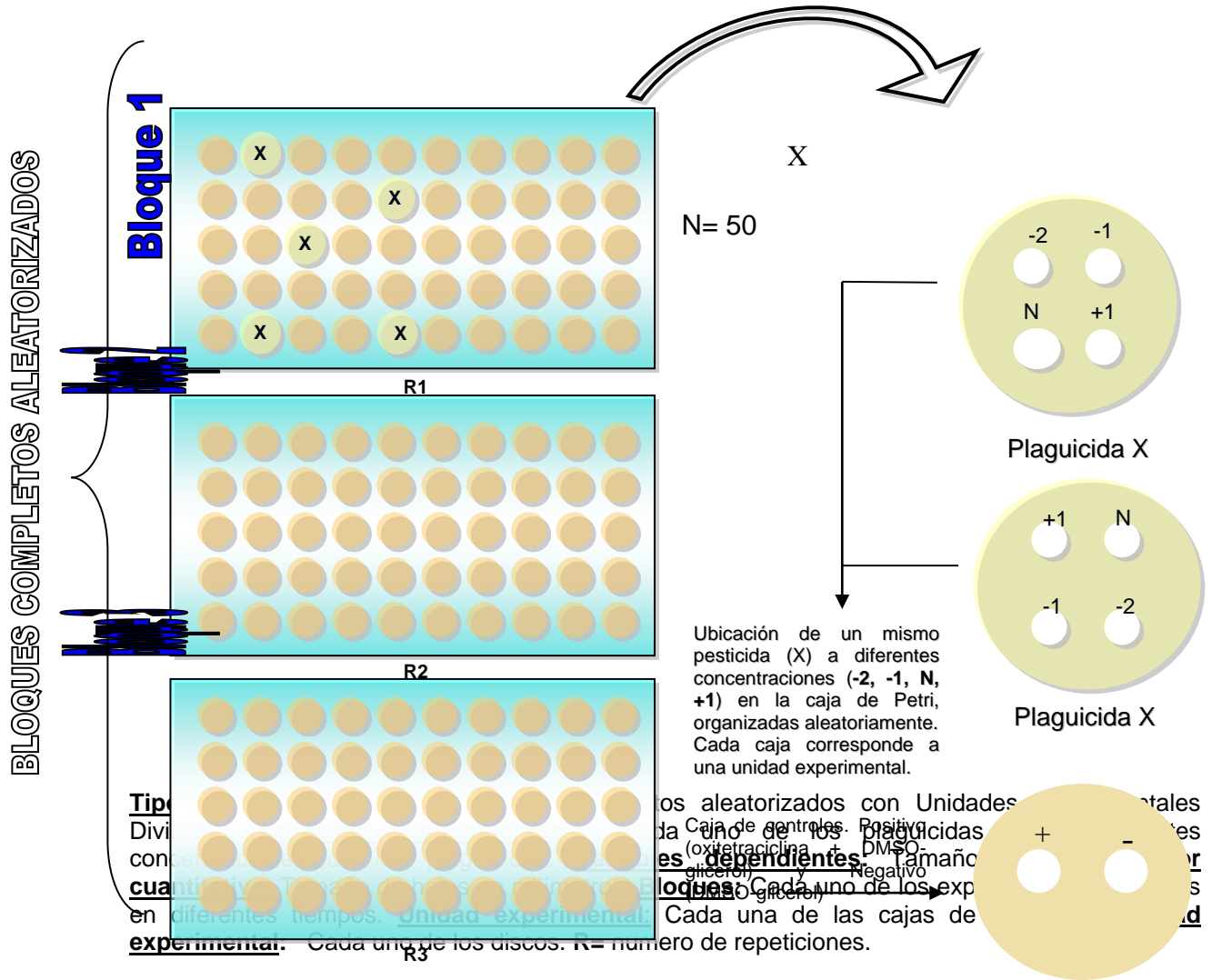
### **3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.**

Para la realización de dicha investigación se llevo a cabo un tipo de diseño de bloques completos aleatorizados con unidades experimentales divididas, como variables independientes cada uno de los plaguicidas y las diferentes concentraciones de los plaguicidas; como variable dependiente el tamaño de halo; el factor cuantitativo será el diámetro del halo en milímetros. Los bloques serán cada uno de los experimentos realizados en diferentes tiempos; la unidad experimental cada una de las cajas de Petri y la subunidad experimental cada uno de los discos. Grafica 3.

#### **3.4.1 Plan de Procesamiento y Análisis Estadístico**

Para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos en la investigación se utilizo el programa SPSS para Windows, versión 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), para el análisis de varianza se aplico una prueba de análisis de varianza factorial y prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. Además se realizo una prueba de correlación lineal de Pearson.

**Grafica 3.** Esquema que ejemplifica el diseño experimental utilizado.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRUEBAS DE TOXICIDAD

Los diámetros de los halos de inhibición correspondientes a los plaguicidas en general se ajustan a la distribución normal (Shapiro-Wilk;  $p > 0,05$ ), pero no a la homogeneidad de varianzas (Levene;  $p < 0,05$ ). En consecuencia, los análisis comparativos se realizaron mediante análisis de varianza factorial y prueba de comparaciones múltiples de Dunnet.

Mediante análisis de varianza se establece que hay diferencias estadísticamente significativas entre plaguicidas, ( $f = 304,2$ ;  $p = 0,000$ ) y entre concentraciones ( $f = 158,13$ ;  $p = 0,000$ ) (ver anexo 1). No obstante las diferencias entre plaguicidas son dependientes de la concentración puesto que la interacción plaguicida-concentración fue significativa estadísticamente ( $f = 9,09$ ;  $p = 0,000$ )

Por medio de un análisis de comparación múltiple de Dunnet (Ver anexo 2), se logra establecer lo siguiente:

El Manzate ( $14,620\text{mm} \pm 2,1$ ), el Curzate ( $12,81\text{mm} \pm 2,3$ ) y el Format ( $11,63\text{mm} \pm 1,65$ ) son los plaguicidas con promedio de diámetros de halos más alto y difieren significativamente entre sí y de los demás grupos que se mencionan a continuación ( $p < 0,005$ ).

El Gramoxone, Tordon, y el Roundup con los promedios  $9,37\text{mm} \pm 2,15$ ,  $9,5\text{mm} \pm 1,4$  y  $8,99\text{mm} \pm 0,73$  respectivamente, no difieren significativamente entre sí ( $p > 0,05$ ) y ocupan el segundo lugar en cuanto a menor efectividad.

El plaguicida de menor efecto es el Lorsban con un promedio de halo de inhibición de  $7,7\text{mm} \pm 0,89$  difiriendo significativamente del resto de los plaguicidas ( $p = 0,000$ ).

En la tabla 5, se presentan los valores promedios de cada uno de los plaguicidas anteriormente nombrados.

Por otra parte el Combo, Tamaron y Furadan conforman un cuarto grupo de plaguicidas, los cuales no produjeron halos de inhibición en ninguna de sus concentraciones evaluadas (ver tabla 6), por lo tanto no presentaron toxicidad frente a *B. subtilis*.



Según los resultados obtenidos en el bioensayo se observó que siete de los diez plaguicidas utilizados presentaron toxicidad sobre *B. subtilis* ATCC6633, destacándose los fungicidas, como los plaguicidas que produjeron los mayores

halos de inhibición (ver grafica 4), en donde el Manzate, presentó el mayor valor promedio (14.6mm), seguido del Curzate (12.8mm) y Format (11.6mm). En cuanto a los herbicidas estos presentaron en general un tamaño de halo intermedio, destacándose el Tordon con un tamaño de halo promedio de 9.5mm, el Gramoxone con 9.3mm y el Roundup con 8.9mm, Por otra parte, el Combo fue el único herbicida que no produjo halos de inhibición.

De los tres insecticidas empleados en el estudio, Tamaron, Furadan y Lorsban, solo este último presentó toxicidad. Vale la pena resaltar que los halos de inhibición presentados por el Lorsban fueron los más pequeños, con respecto a los generados por los otros plaguicidas, siendo su valor promedio de 7.7mm.

**Tabla 5.** Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de los plaguicidas que causaron efecto toxico, según las concentraciones evaluadas.

GRUPO DE PLAGUICIDAS	CONCENTRACIONES				Promedio total de los plaguicidas	P(a)
	-2	-1	N	+1		
<b>Manzate</b>	13.06±1,92	13,50±1,83	15,65 ± 1,68	16.25 ± 1,21	<b>14.62±2.1</b>	0,00
<b>Curzate</b>	9.94 ± 0.45	12.41 ± 0.86	13.30 ± 1.08	15.56 ± 1.01	<b>12.86±2.3</b>	
<b>Format</b>	9.55 ±0.66	11.11 ± 0.82	12.67 ±1.04	13.21 ± 0.73	<b>11.63±1.65</b>	
<b>Gramoxone</b>	8.59 ± 1.37	8.08 ± 1.49	8.50 ± 1.21	12.32 ± 0.73	<b>9.37±2.15</b>	
<b>Tordon</b>	8.23 ± 0.37	9.16 ± 0.97	9.99 ± 1.33	10.80 ± 1.24	<b>9.54±1.41</b>	
<b>Roundup</b>	8.15 ± 0.52	9.0 ± 0.60	9.27 ± 0.52	9.5 ± 0.43	<b>8.99±0.73</b>	
<b>Lorsban</b>	6.93 ± 0.45	7.59 ± 0.73	7.99 ± 0.95	8.45 ± 0.60	<b>7.74±0.89</b>	
<b>Promedio total de las concentraciones</b>	<b>9.212±2.1</b>	<b>10.124±2.3</b>	<b>11.056±2.8</b>	<b>12.309±2.8</b>	<b>P(c) =0,00</b>	
<b>P(b)</b>	0,000					

**P(a)**= Significancia estadística entre Plaguicidas

**P(b)**= Significancia estadística entre concentraciones

**P(c)**= Significancia estadística interacción Plaguicidas-concentración.

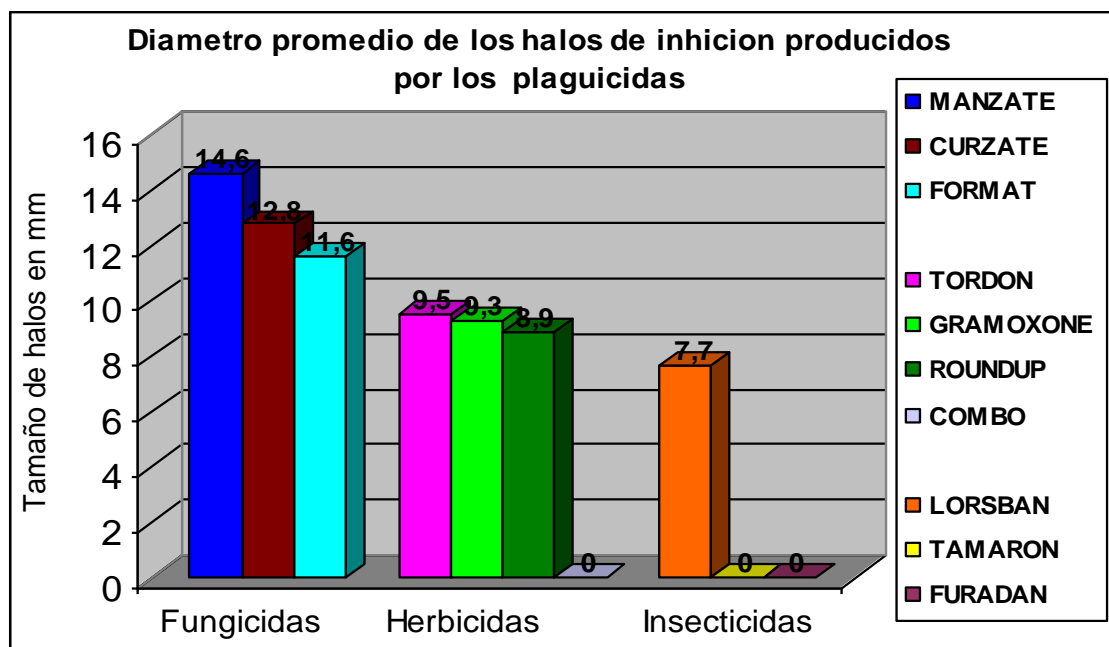
\* Las anteriores significancias fueron obtenidas mediante un análisis de varianza factoriales.

\*\* Los promedios de los diámetros de los halos se expresan en mm.

**Tabla 6.** Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de los plaguicidas que no causaron ningún efecto toxico, según las concentraciones evaluadas

GRUPO DE PLAGUICIDAS	CONCENTRACIONES				Promedio total de los plaguicidas
	-2	-1	N	+1	
Combo	0	0	0	0	0
Tamaron	0	0	0	0	0
Furadan	0	0	0	0	0
Promedio total de las concentraciones	0	0	0	0	

**Grafica 4.** Diámetro promedio de los halos de inhibición producidos por los plaguicidas.



En cuanto a las concentraciones, al ser sometidas a un análisis de comparaciones múltiples prueba de Dunnet (ver anexo 2), se determinaron las siguientes relaciones:

La concentración que produjo una mayor toxicidad fue la +1 con un valor promedio de 12,3mm  $\pm$ 2,8 y la cual es estadísticamente diferente a las demás concentraciones utilizadas ( $p < 0,05$ ).

Las concentraciones -1 y N con un promedio de 10.12mm  $\pm$ 2.3 y 11.05mm  $\pm$ 2.89 respectivamente, no difieren significativamente entre si ( $p > 0,00$ ) y ocupan un nivel medio en cuanto a toxicidad.

La concentración -2 produjo la menor toxicidad, con un valor promedio de  $9,2\text{mm} \pm 2,8$  difiriendo significativamente de las concentraciones anteriormente mencionadas ( $p < 0,05$ ).

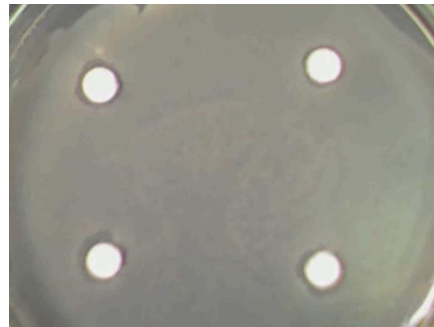
Al detallar la tabla 5, se observa cada uno de los plaguicidas a sus diferentes concentraciones, destacándose como se mencionó anteriormente, el Manzate, el cual en la concentración +1 el halo de inhibición fue de  $16,25\text{mm} \pm 1,21$ , siendo este el de mayor toxicidad encontrado, seguido por el Curzate, cuyo promedio del halo de inhibición a la concentración +1 fue de  $15,56\text{mm} \pm 1,01$ . El tercer puesto lo ocupó el Format a concentración +1, con un promedio de halo de  $13,21\text{mm} \pm 0,73$ . Los otros plaguicidas se ubican en orden descendente respectivamente. Gramoxone, con un promedio de halo de  $12,32\text{mm} \pm 0,73$ , el Tordon, con promedio de halo de  $10,80\text{mm} \pm 1,24$ , el Roundup, cuyo diámetro de halo fue de  $9,5\text{mm} \pm 0,43$ . En ultimo lugar se encuentra el Lorsban, cuyo promedio de halo a la fue de  $8,45\text{mm} \pm 0,60$ . Todos los promedios de los halos aquí descritos corresponden a la máxima concentración empleada en el estudio (+1).

En la Grafica 5 podemos observar algunas fotografías de halos de inhibición producidos por los plaguicidas.

**Grafica 5.** Fotografía de los halos de inhibición producidos por algunos de los plaguicidas. a) Format, b) Lorsban, c) Curzate.



inhibición producidos por el Format.



a) Halos de inhibición producidos por el Lorsban.

b) Halos de



c) Halos de inhibición producidos por el Curzate.

Se identificó la asociación lineal positiva, significativa estadísticamente (Pearson:  $p= 0,00$ ), entre la concentración de cada plaguicida y el diámetro de halo.

Mediante los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) (ver grafica 6) se puede inferir que la variabilidad que se observa en el diámetro, depende de la concentración para los plaguicidas así:

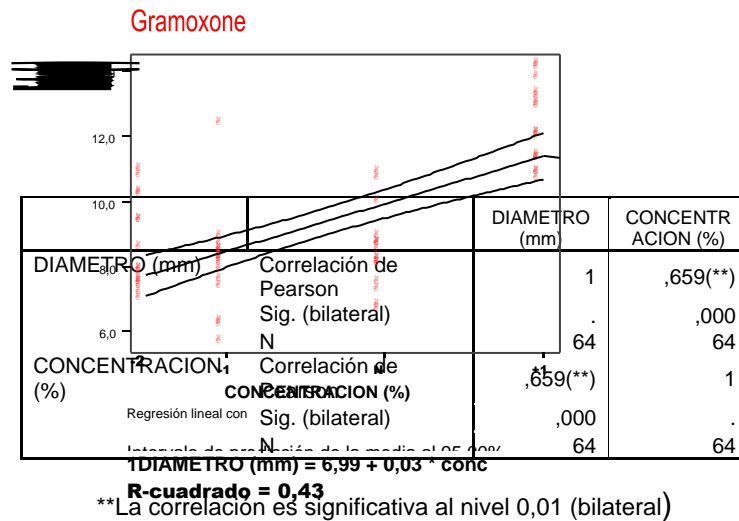
La influencia mas alta se encuentra en el grupo conformado por el Curzate, con un 68%, y el Format con un 70%.

Una influencia intermedia se encontró en el grupo conformado por los plaguicidas: Manzate con un 39%, Gramoxone con un 43%, Tordon con un 45% y Roundup con un 41%.

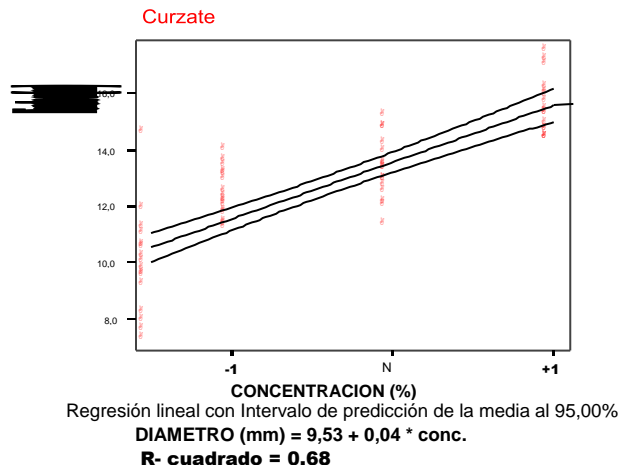
Por ultimo, el plaguicida Lorsban, con un 18% se generó la influencia más baja, aunque significativa de las concentraciones sobre los plaguicidas.

**Grafica 6. Correlaciones estadísticas de cada uno de los plaguicidas**

**a) Correlaciones Gramoxone**



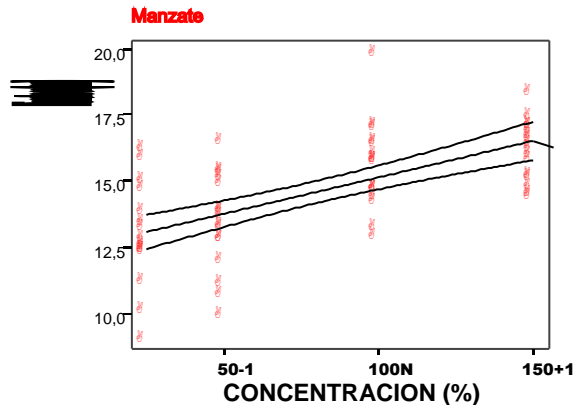
**b) Correlaciones Curzate**



		DIAMETRO (mm)	CONCENTRACION (%)
DIAMETRO (mm)	Correlación de Pearson	1	,825(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000
	N	64	64
CONCENTRACION (%)	Correlación de Pearson	,825(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	.
	N	64	64

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

### c) Correlación Manzate



Regresión lineal con Intervalo de predicción de la media al 95,00%

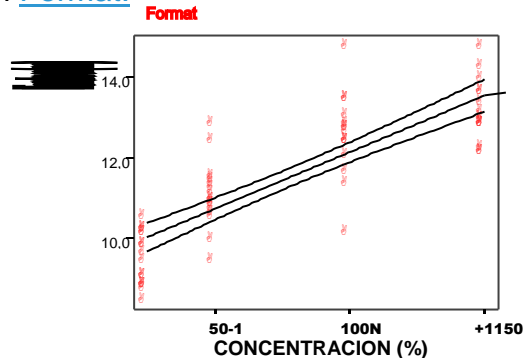
$$\text{DIAMETRO (mm)} = 12,38 + 0,03 * \text{conc}$$

**R-cuadrado = 0,39**

		DIAMETRO (mm)	CONCENTRACION (%)
DIAMETRO (mm)	Correlación de Pearson	1	,626(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000
	N	64	64
CONCENTRACION (%)	Correlación de Pearson	,626(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	.
	N	64	64

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

d) Correlacion del Format.

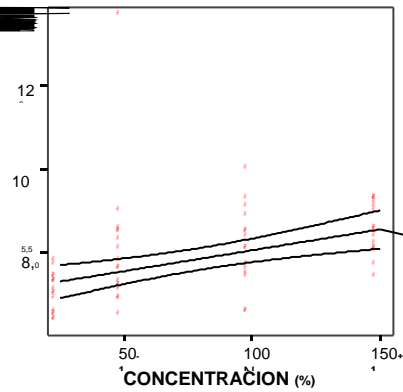


Regresión lineal con Intervalo de predicción de la media al 95,00%  
**DIAMETRO (mm) = 9,32 + 0,03 \* conc**  
**R-cuadrado = 0,70**

		DIAMETRO (mm)	CONCENTRACION (%)
DIAMETRO (mm)	Correlación de Pearson	1	,834(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000
	N	63	63
CONCENTRACION (%)	Correlación de Pearson	,834(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	.
	N	63	63

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

d) Correlación Lorsban



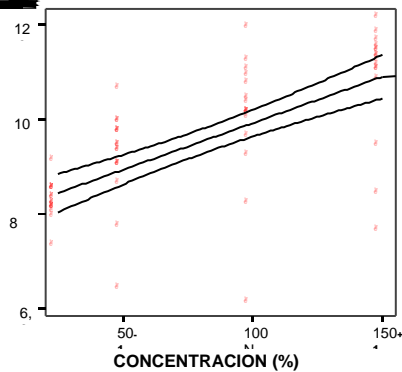
Regresión lineal con Intervalo de predicción de la media al 95,00%  
 $DIAMETRO (mm) = 7,04 + 0,01 * conc$

**R-cuadrado = 0,18**

		DIAMETRO (mm)	CONCENTRACION (%)
DIAMETRO (mm)	Correlación de Pearson	1	,423(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000
	N	64	64
CONCENTRACION (%)	Correlación de Pearson	,423(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	.
	N	64	64

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

e) Correlación Tordon



Regresión lineal con Intervalo de predicción de la media al 95,00%

$DIAMETRO (mm) = 7,95 + 0,02 * conc$

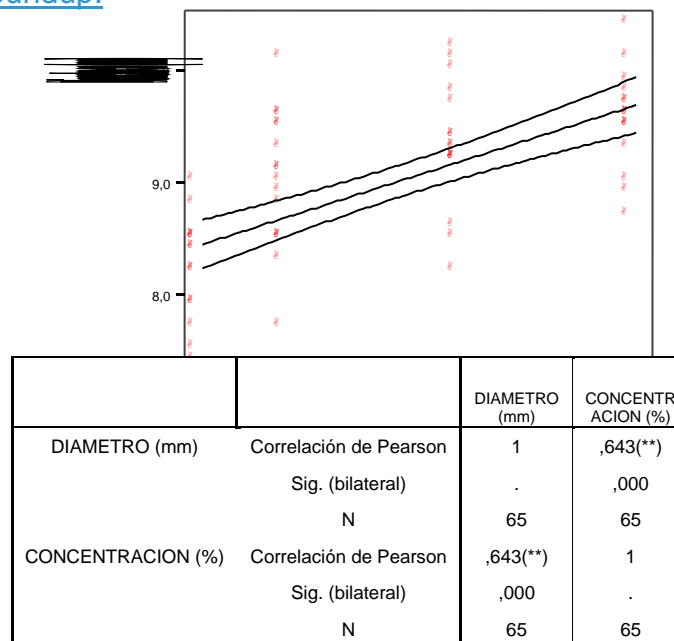
**R-cuadrado = 0,45**

		DIAMETRO (mm)	CONCENTRACION (%)
DIAMETRO (mm)	Correlación de Pearson	1	,673(**)
	Sig. (bilateral)	.	,000
	N	64	64
CONCENTRACION (%)	Correlación de Pearson	,673(**)	1
	Sig. (bilateral)	,000	.
	N	64	64



\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

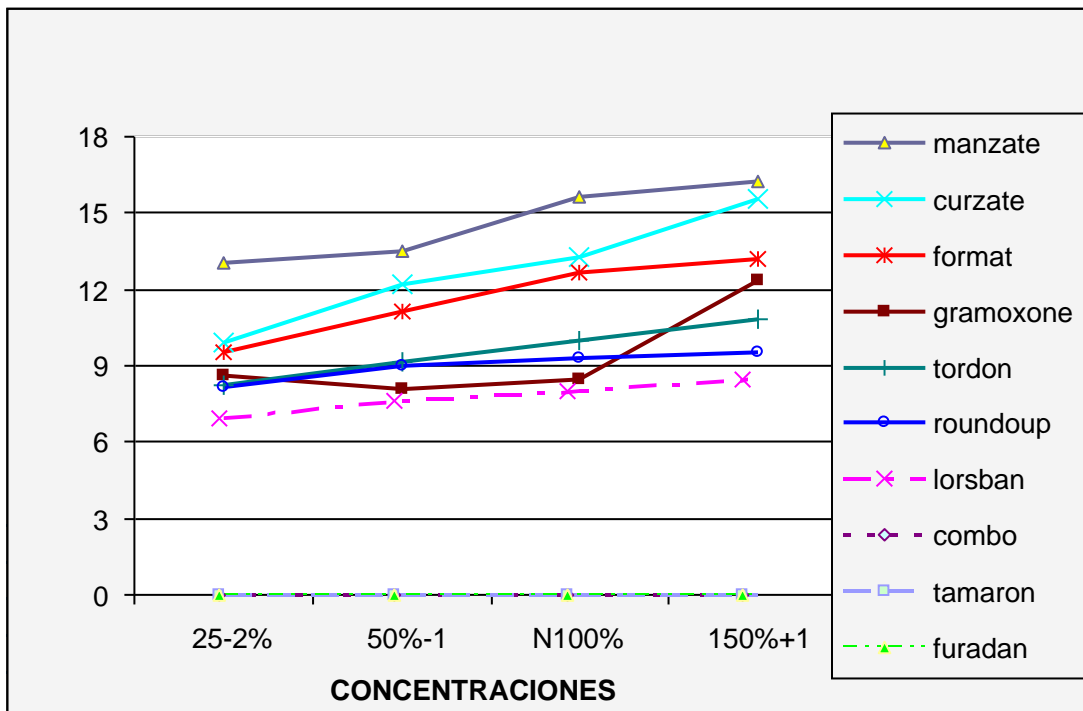
f) Correlación Roundup.



\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En la grafica 7, se puede observar la asociación lineal, la cual describe un comportamiento directamente proporcional entre las concentraciones empleadas y la formación de los halos, es decir que a mayor concentración, mayor tamaño de halo de inhibición, por lo cual el mayor nivel toxicológico es para la concentración del +1, con un promedio de diámetro de halos de (12.3mm), seguido de la concentración N con (11.0mm), la del -1 con (10.1mm) y por ultimo la concentración de -2 con (9.4mm).

**Grafica 7.** Diámetro de los halos de inhibición vs. Concentraciones de los plaguicidas.



En consecuencia la mayor toxicidad para *Bacillus subtilis* es la del Manzate con un 79,3% de efectividad seguido del Curzate y Format con 69,5% y 63,45% respectivamente.

El segundo grupo lo conforman el Tordon con 51,6% de efectividad toxica media, el Gramoxone con 50.5% y el Roundup 48.36%.

Una efectividad toxica baja pero presente, es la obtenida con el Lorsban con 41,84%.

Finalmente se presentan los plaguicidas que no mostraron ningún tipo de toxicidad hacia el microorganismo, estos son: Combo 0%, Furadan 0% y Taron 0%.

**Tabla 7.** Porcentajes de efectividad toxica de cada uno de los plaguicidas frente al control positivo (Oxitetraciclina).

	PROMEDIO DEL DIAMETRO DE HALOS EN mm	PORCENTAJE DE EFECTIVIDAD
<u>OXITETRACICLINA CONTROL POSITIVO (+)</u>	<u>18,4</u>	<u>100%</u>
<u>DMSO+GLICEROL CONTROL (-)</u>	<u>0</u>	<u>0%</u>
<u>MANZATE</u>	<u>14,6</u>	<u>79.34%</u>
<u>CURZATE</u>	<u>12,8</u>	<u>69.5%</u>

<u>FORMAT</u>	<u>11,6</u>	<u>63.4%</u>
<u>GRAMOXONE</u>	<u>9,3</u>	<u>50.5%</u>
<u>TORDON</u>	<u>9,5</u>	<u>51.6%</u>
<u>ROUNDUP</u>	<u>8,9</u>	<u>48.36%</u>
<u>COMBO</u>	<u>0</u>	<u>0%</u>
<u>FURADAN</u>	<u>0</u>	<u>0%</u>
<u>TAMARON</u>	<u>0</u>	<u>0%</u>
<u>LORSBAN</u>	<u>7,7</u>	<u>41.84%</u>

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En general y a partir de los datos, se observa que la mayoría de los plaguicidas empleados (siete de diez), presentan toxicidad para la cepa utilizada en el bioensayo. Hubo diferencia significativa entre plaguicidas ( $f=304,2$ ;  $p=0.000$ ) y a su vez diferencia significativa entre las concentraciones empleadas ( $f=158.13$ ;  $p=0.000$ )

En la grafica 7, se observa una clara diferencia en el comportamiento de las concentraciones empleadas. La mayoría de los plaguicidas mostraron que a medida que aumenta la concentración aumenta el tamaño del halo de inhibición y por lo tanto la toxicidad sobre *B. subtilis*, demostrando que hubo una influencia estadísticamente significativa de la concentración sobre el plaguicida ( $f=9.09$ ;  $p=0.000$ )

Si se analizan los plaguicidas teniendo en cuenta su acción toxica (Fungicida, Herbicida, Insecticida), se encontrará que los fungicidas son el conjunto que presentó una mayor toxicidad. Este grupo lo conforman el Manzate ( $14,62\text{mm} \pm 2.1$ ), Curzate ( $12.81\text{mm} \pm 2,3$ ) y Format ( $11,63\text{mm} \pm 1.65$ ), respectivamente. Como es bien sabido los hongos poseen una alta capacidad de resistencia y tolerancia a ambientes adversos, debido a esto se hace necesaria la utilización de compuestos químicos altamente tóxicos para su erradicación. Si se toma este grupo y se observa su composición química, se puede podemos inferir que los plaguicidas Curzarte y Manzate se hallan altamente relacionados debido a que ambos poseen como principal ingrediente activo el **mancozeb**, cuya función sistémica es trabajar en coordinación con los iones de zinc. A su vez este modo de acción sistémico es también el mismo utilizado por el **propineb**, el cual es el principal ingrediente activo del Format. Aunque se sabe que el zinc es un micronutriente esencial para la célula, cuando su sistema de transporte se ve afectado, puede variar las concentraciones de este en la célula, convirtiéndose toxico en dosis elevadas; ya que este actúa como cofactor en muchos procesos metabólicos mediados por enzimas (Comunicación Protocolo. 2005). Dicho efecto es corroborado por investigaciones realizadas en el control de microorganismos patógenos en el tracto digestivo del cerdo en las cuales, se han tratado estas infecciones, utilizando el zinc en forma de Oxido de zinc o Formiato de zinc en cantidades mínimas de (160-180 ppm Zn) en acción conjunta con el antibiótico indicado, las cuales arrojaron resultados positivos contra la infección bacteriana (<http://www.midiotecavipec.com/nutricion/nutricion110106.htm>).

Por lo anteriormente descrito, se puede inferir que el Zinc es el directamente responsable de la toxicidad causada por estos plaguicidas en *B. Subtilis* y que en efecto los fungicidas se ubiquen como el grupo mas toxico en el presente trabajo.

En este caso la **estructura química** de los funguicidas en conjunto con el Zinc, estarían interrumpiendo los procesos metabólicos llevados a cabo por las proteínas y enzimas propias de *B. subtilis* lo que conllevaría a la muerte del mismo.

Por otra parte, los herbicidas utilizados presentaron un nivel tóxico similar entre ellos. Tanto el Tordon, Roundup y Gramoxone ( $9.37\text{mm} \pm 2.15$ ,  $9.5\text{mm} \pm 1.4$  y  $8.99\text{mm} \pm 0.73$  respectivamente) no difieren significativamente entre sí ( $p > 0.05$ ) a excepción del plaguicida Combo, el cual no mostró ningún nivel de toxicidad en las concentraciones evaluadas. Este plaguicida está compuesto por dos ingredientes activos el metsulfuron y picloram, este último es también uno de los ingredientes activos del Tordon, que a diferencia del Combo, sí mostró un efecto tóxico, entonces ¿Por qué el Tordon sí mostró un efecto tóxico y el Combo no? La respuesta **se** podría deber al ingrediente activo acompañante del Tordon, el 2,4-D, el cual se ha demostrado en diversas investigaciones realizadas su efecto altamente tóxico, por ejemplo, provoca disminución de la producción de ATP, inhibición de enzimas que participan en el metabolismo de lípidos y síntesis proteica, inhibición de enzimas detoxificantes del hígado, inhibición de la síntesis de ADN y disrupción del sistema nervioso (Zychilnski & Zolnierowicz, 1996; El Kebbaj et al., 1995; Rivarola & Balengo, 1991; Rivarola et al., 1992; Singh & Awasthi, 1985).

En cuanto al Roundup, que es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en el mundo, se han realizado una gran variedad de investigaciones en las que se afirma que es un plaguicida de baja toxicidad aguda y con nulos efectos en la salud humana, a excepción de algunas irritaciones cutáneas, no se difumina por la cadena trófica, no es cancerígeno y solo ataca a la especie objetivo (Monsanto, 2005) ([www.minagricultura.gov.co/media/104703859.pdf](http://www.minagricultura.gov.co/media/104703859.pdf)); como también otros estudios que afirman lo contrario, por ejemplo La EPA lo tiene clasificado como un irritante medio, pero la Organización Mundial de la Salud ha encontrado efectos más serios, en varios estudios con conejos fue calificado como "fuertemente" irritante o "extremadamente" irritante, otras investigaciones realizadas en diversos organismos se encontró que el Roundup y el Pondmaster (otra formulación) incrementaron la frecuencia de mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en mosca de la fruta; el Roundup en dosis altas, mostró un incremento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y fue débilmente mutagénico en la bacteria Salmonella. También se ha reportado daño al DNA en pruebas de laboratorio con tejidos y órganos de ratón (Cox 1995). Un estudio realizado en la Universidad del Cauca evaluó los efectos citotóxicos/genotóxicos del Roundup (Glifosato) en ratones, el cual muestra que este herbicida induce efecto letal dominante en células germinales y células somáticas (Chicangana y Uribe 2006).

Un grupo de científicos de la Universidad Nacional de Colombia puso a prueba el glifosato con peces de la especie cachama blanca, del departamento del Meta. En el estudio encontraron que las branquias y el hígado de los peces fueron los

principales órganos afectados por la acción del herbicida, que es el mismo con el que se están fumigando los cultivos ilícitos en Colombia (MENDIVELSO. 2008). Sin embargo, en este estudio se encontró que el glifosato mostró una toxicidad media ante el *B. subtilis*, microorganismo típico del suelo con un alto potencial como indicador en el ambiente del suelo.

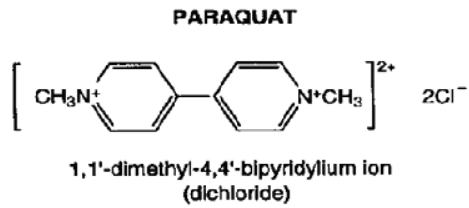
Es evidente que el glifosato, en estas investigaciones y en muchas otras no citadas, ha demostrado toxicidad, pero en muy pocas de ellas se afirma que es letal y extremadamente tóxico para los organismos expuestos, sus efectos nocivos están presentes, pero no son lo suficientemente contundentes para acabar con la vida de estos. En los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede indicar que el Roundup sí produjo una toxicidad en *B. subtilis* pero dicha toxicidad es una de las más bajas, en comparación con los otros plaguicidas que se evaluaron y que fueron tóxicos, con lo cual se evidencia la presencia de toxicidad; pero existen otros plaguicidas que demostraron ser mucho más severos en sus efectos tóxicos por lo menos para el microorganismo utilizado en esta prueba.

Con respecto a los insecticidas, se observó que, a nivel general no presentaron ningún tipo de toxicidad frente a *B. subtilis* a excepción del Lorsban, el cual sí la presentó ( $7.7\text{mm} \pm 0.89$ ) difiriendo significativamente del resto de los plaguicidas ( $p=0.000$ ), siendo el menos tóxico de todos.

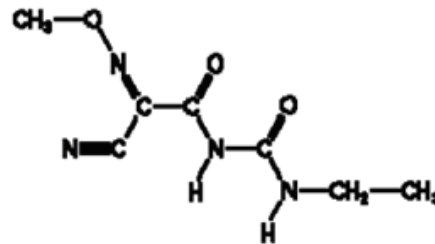
A pesar de que el Lorsban y Tamarón pertenecen al mismo grupo químico de los organofosforados y cuyo efecto tóxico se basa en la inactivación de la colinesterasa, los plaguicidas mostraron resultados diferentes. El Lorsban sí produjo halos de inhibición, caso contrario al Furadán y Tamarón que no presentaron ningún nivel de toxicidad sobre *Bacillus subtilis*. Estos resultados coinciden con estudios ecotoxicológicos realizados en caracoles, empleando al caracol dulce acuícola *Physa venustula* como herramienta para la evaluación de riesgos ambientales. Los caracoles fueron expuestos a diferentes tiempos al Clorpyrifos, ingrediente activo del Lorsban, el cual produjo efectos letales y subletales superiores, con relación a los que se observaron al ser expuestos al Metamidofos, ingrediente activo de Tamarón (Iannacone, et al. 2002). Si se observan bien, las estructuras químicas y las fórmulas moleculares del Clorpyrifos y el Metamidofos (ver Gráfica 8), encontraremos que el primero posee mayor número de Carbonos y Oxígenos, haciendo que la estructura sea mucho más compleja que el Metamidofos, y por ello más estable debido a sus interacciones moleculares, lo cual conlleva posiblemente a generar mayor toxicidad.

**Grafica 8.** Estructura química de los plaguicidas

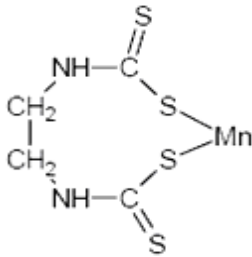
a) Gramoxone ( Paraquat)



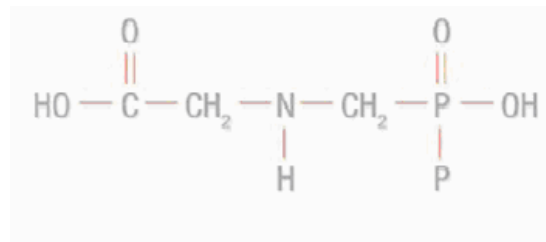
b) Curzate (Cymoxanil)



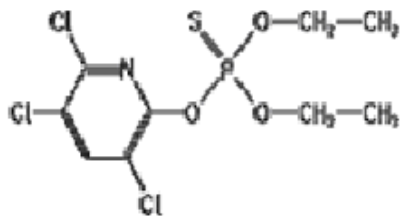
c) Manzate (Mancozeb)



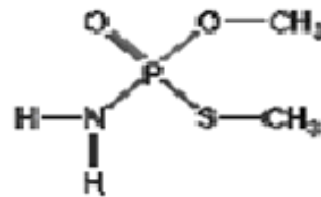
d) Roundup (Glifosato)



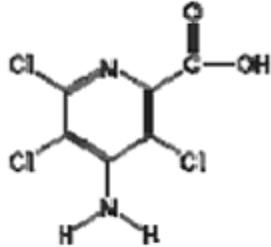
e) Lorsban (Clorpirifos)



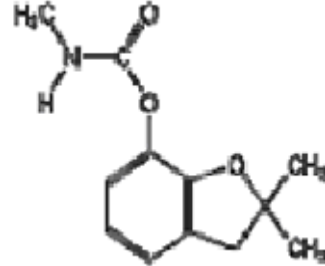
b) Tamaron (Metamidofos)



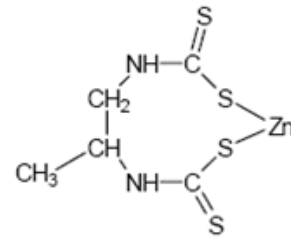
d) Tordon (Picloram)



e) Furadan (Carbofuran)



f) Format (Propineb)



Aunque se disponen de muy pocos estudios realizados con el Carbofuran, (ingrediente activo del Furadan), que permitan realizar una comparación frente a los otros insecticidas, sí se encontró un estudio de “distribución de *Physa acuta* (*Gastropoda: Physae*) en Malasia y su conveniencia como material de prueba para estudios de toxicidad de insecticidas” (HAJI. 1993). En dicha investigación se muestra que el Carbofuran tiene algunos leves efectos tóxicos secundarios similares a los del Lorsban, pero que este último es visiblemente superior en sus demás efectos tóxicos. De esta manera se corroboran los datos obtenidos en el estudio, ya que solo el plaguicida Lorsban presentó halos de inhibición frente a los otros plaguicidas del grupo de los insecticidas.

Desde otro punto de vista es de anotar que el herbicida Gramoxone presentó un comportamiento irregular en cuanto al efecto tóxico según la concentración (Grafica 7), ya que en la concentración menor (-2), presenta halos de inhibición de diámetros superiores a las dos concentraciones subsiguientes a ella (-1) y (N) respectivamente. Finalmente en la concentración del (+1), los halos presentan mayor tamaño, es decir, su diámetro es superior al de las otras tres concentraciones.

Analizando el comportamiento del Gramoxone, este puede explicarse desde el punto de vista de los procesos involucrados en la biodegradación de sustancias contaminantes llevadas a cabo por microorganismos, los cuales dependen de las estructuras y propiedades físico-químicas de dichos compuestos, así como del proceso mismo de la biodegradación.



El Gramoxone a concentración de -2, mostró una toxicidad mayor que en -1 y N, debido quizá a los metabolitos que se producen en el proceso de interacción con el microorganismo al utilizarlo como fuente de energía y/o carbono. Quizá los metabolitos (subproductos) son mejor utilizados por el *B. subtilis* para su crecimiento, los cuales aumentan paulatinamente al aumentar la concentración, pero cuando ésta se encuentra en exceso, en este caso en concentración de +1, la sustancia presenta mayor toxicidad para el microorganismo porque supera la capacidad de carga del mismo al volverse altamente tóxico (Maier, 2000). Además la alta concentración puede afectar a los componentes celulares, reaccionar adversamente con las enzimas biodegradativas, o de las enzimas que son responsables de que el microorganismo utilice el contaminante como fuente de energía o de carbono para su crecimiento.

Además se debe tener en cuenta la estructura química de las moléculas contaminantes ya que estas poseen un **efecto eléctrico** (su carga) la cual interfiere en la sustitución de grupos moleculares de proteínas y enzimas vitales para el desempeño de microorganismo, estas reacciones generalmente hacen mas estable a la sustancia contaminante, lo que complica mas su degradación; además estas cargas eléctricas reaccionan con las proteínas de membrana del microorganismo causándole una inestabilidad, debido a que interfieren en los sistemas de transporte de entrada y salida de nutrientes, y en otras funciones vitales.

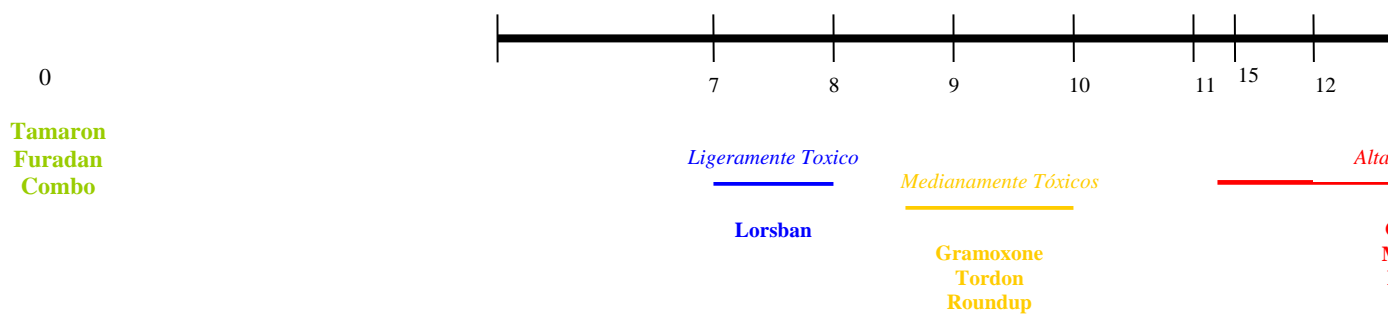
La influencia de uno o varios de los factores anteriormente mencionados, se ve reflejada en el diámetro de los halos de inhibición, en el caso del Gramoxone se halla la necesidad de realizar estudios acerca de las rutas metabólicas en la degradación de estos agroquímicos. Además en el análisis estadístico de Dunnet para las concentraciones, se observa que al utilizar las concentraciones -1 y N no hay diferencia significativa entre ellas, es decir que en general poseen el mismo efecto tóxico.

Se estableció una asociación lineal positiva, significativa estadísticamente (Pearson:  $p= 0,00$ ), entre la concentración de cada plaguicida y el diámetro de halo, notándose que la diferencia significativa existente entre el empleo de una concentración u otra, influye de forma diferente en cada plaguicida, ya que los valores porcentuales analizados difieren de forma alta ([Curzate 68%](#) / [Format 70%](#)), intermedia ([Manzate 39%](#) / [Gramoxone 43%](#) / [Tordon 45%](#) / [Roundup 41%](#)) o baja ([Lorsban 18%](#)). Con respecto a esto se observa que el plaguicida cuyas concentraciones influyen menos sobre su efecto es el Lorsban.

Mediante el análisis de comparación múltiple de Dunnet (Ver anexo 2) el estudio, se pueden diferenciar claramente cuatro grupos de plaguicidas según la magnitud del efecto tóxico presentado sobre *Bacillus subtilis* (ver Grafica 8).

Mediante el análisis realizado al comportamiento toxicológico de los plaguicidas, en comparación al agente control empleado (oxitetraciclina), se logró la estimación porcentual del efecto toxico de estos. La oxitetraciclina al ser el control positivo se determinó con una eficiencia del 100% y con base a ella se corroboraron los resultados obtenidos en el análisis ya que los fungicidas ocuparon el mayor nivel toxicologico (63.4% - 79.34%), seguidos de los herbicidas (48.36% - 50.5%) e insecticidas (únicamente el Lorsban con un 41% de efectividad) respectivamente. Por otra parte logró determinar que los plaguicidas Combo, Furadan y Tamaron pertenecientes al grupo de los insecticidas, tuvieron un 0% en cuanto a la efectividad tóxica sobre *B. subtilis*.

**Grafica 9:** Comparación toxicológica entre los diferentes grupos de plaguicidas empleados en el bioensayo. Escala con valores entre 0 y 15 mm (diámetro de de los halos).



El primero de ellos, conformado por los Insecticidas Tamaron, Furadan y el herbicida Combo, los cuales no presentaron efecto toxico. El siguiente conformado únicamente por el Insecticida Lorsban, el cual presentó el menor índice de toxicidad calificando como ligeramente toxico. El tercer grupo, conformado por los herbicidas: Gramoxone, Tordon y Roundup, los cuales presentan un efecto medianamente toxico. Por ultimo, el cuarto grupo conformado por los fungicidas: Manzate, Curzate y Format, los cuales presentan el mayor efecto toxico reportado y calificados como altamente tóxicos.

## 6. CONCLUSIONES

Mediante las pruebas realizadas con *B. subtilis* ATCC6633, se logró determinar que de los diez plaguicidas empleados, solo siete de ellos generaron algún grado de toxicidad sobre el microorganismo, siendo el plaguicida Manzate el de mayor toxicidad y el Lorsban el de menor toxicidad.

Las pruebas del estudio realizadas con *B. subtilis* ATCC6633, permitieron clasificar a los plaguicidas utilizados en cuatro niveles toxicológicos. No tóxicos: (Tamaron, Furadan y Combo), ligeramente tóxico (Lorsban  $7.7 \pm 0.89$ ), Medianamente tóxicos (Gramoxone  $9.37 \pm 2.15$ , Tordon  $9.5 \pm 1.4$ , y Roundup  $8.99 \pm 0.73$ ) y altamente tóxicos (Curzate  $12.81 \pm 2.3$ , Manzate  $14.620 \pm 2.1$ , y Format  $11.63 \pm 1.65$ ).

Mediante las observaciones realizadas en el estudio y el análisis estadístico de los resultados, se logró constatar un comportamiento directamente proporcional entre la formación de los halos de inhibición y las concentraciones empleadas. A mayor concentración, mayor diámetro del halo de inhibición. No obstante, se determinó que la concentración influye de manera diferente en cada plaguicida.

No existe una diferencia significativa entre el empleo de las concentraciones -1 y N.

De los tres insecticidas empleados en las pruebas de toxicidad con *B. subtilis* ATCC6633, tan solo uno de ellos, el Lorsban, fue tóxico para este microorganismo.

En cuanto a los funguicidas empleados en el estudio, se logró determinar que todos presentaron algún grado de toxicidad, siendo el Manzate el de mayor toxicidad y el Format el de menor.

Con respecto a los herbicidas evaluados en el estudio, se pudo determinar que tres de los cuatro plaguicidas empleados, resultaron en algún grado tóxicos para *B. subtilis* ATCC6633, siendo el herbicida Tordon el que presentó mayor grado de toxicidad y el Roundup el de menor toxicidad. El herbicida Combo no presentó ningún grado de toxicidad en *B. subtilis* ATCC6633.

La comparación de los plaguicidas empleados en el estudio con respecto al grupo control, permitió determinar porcentualmente la toxicidad de los plaguicidas frente al microorganismo, siendo el efecto de la oxitetraciclina el 100% y eventualmente Manzate 79.34%, Curzate 69.5%, Format 63.4%, Tordon 51.6%, Gramoxone 50.5%, Roundup 48.36% y Lorsban 41.84.

*B. subtilis* ATCC6633 demostró ser un microorganismo eficaz, para la realización del bioensayo en la prueba de toxicidad; ya que permitió realizar una clasificación toxicológica en los plaguicidas empleados.

## 7. RECOMENDACIONES

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 puede ser empleado en pruebas de evaluación de toxicidad de este tipo de compuestos químicos y es un potencial bioindicador de toxicidad en suelos, al ser este su hábitat natural.

El estudio realizado demostró que un 70% de los plaguicidas utilizados en el municipio de Popayán causó efecto tóxico en *Bacillus subtilis* ATCC 6633 lo que sugiere realizar estudios que demuestren una alteración del ecosistema del suelo; El microorganismo empleado en el estudio es uno de los más representativos de este ambiente, por lo tanto es necesario continuar con análisis que permitan medir de manera más amplia el impacto que generan estos plaguicidas en los componentes bióticos y abióticos del suelo.

Es recomendable realizar mayor cantidad de estudios sobre biodegradación de pesticidas en donde se logre aclarar el porqué de la toxicidad de los mismos, así como el efecto que pueden tener los subproductos en el proceso, por ello sería interesante realizar investigaciones a nivel molecular que permitan ampliar el conocimiento de las rutas metabólicas, así como el efecto de los contaminantes a nivel celular.

Es muy importante realizar estos estudios en forma interdisciplinaria, en donde se puedan complementar los resultados con investigaciones de carácter bioquímicas, químicas, fisiológicas y genéticas, entre otros, que complementen y profundicen sobre los efectos de estos contaminantes en el suelo.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ABREU P., Juan; MARTINEZ M., Migdalia; TOLEDO C., Grises y GARCIA C., Osmaida. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA PRELIMINAR DEL FRUTO DE *Bromelia pinguin* L. (Piña De Ratón). Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de la Habana. En: Revista Cubana Farm. Vol.35, No.1. (ene-abr. 2001).

BASTIDAS M., Diela y GOMEZ S., Melba. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL MUTAGÉNICO DE MEZCLAS DE PLAGUICIDAS USADAS EN EL HUILA. Universidad Surcolombiana. Neiva, 1999.

CANDELA, Maria. Efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del furadán en meristemas radiculares de *Allium Cepa*. Popayán, 2005. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Área de genética.

CHICANGANA, Carlos y URIBE, Nasly. Evaluación de los efectos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos in vivo del roundup (glifosato) mediante la prueba de letales dominantes en ratón (*Mus Musculus*). Popayán, 2006. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Área de genética.

COX, Caroline. Glyphosate, Part 1: Toxicology. En: Journal of Pesticides Reform. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR. USA. Vol. 15, No. 3. (Fall 1995).

COX, Caroline. Glyphosate, Part 2: Human exposure and ecological effects. En: Journal of Pesticides Reform. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR. USA. Vol. 15, No. 4. (Winter 1995).

LIU, D.; KWASNIEWKA, K.; CHAU, Y.K. y DUTKA, B.J. A Four-Hour Agar Plate Method for Rapid Toxicity Assessment of Water-Soluble and Water-Insoluble Chemicals. National Water Research Institute. En: Environmental Toxicology and Water Quality, an International Journal. Vol. 6. 1991. p.437-444.

ECHARRI, Luís. Ciencias de la tierra y del medio ambiente. Barcelona. Editorial Teide S.A. 1998.

KEBBAJ, M. S.; CHERKAOUI, M. y LATUFFRE, N.. Effects of peroxisomes proliferators and hypolipemic agents on mitochondrial inner membrane linked D-3-hydroxybutirate dehydrogenase (BDH). En: Biochemistry and Molecular Biology International. 1995. Vol. 35. p.65-77.

FIELDING, M.; BARCELÓ, D.; HELWEQ, A.; GALASSI, S.; TORTENSSON, L.; VAN ZONEN, P.; WOLTER R. y ANGELITTI G., Pesticides Ground and Drinking Water Pollution Rehear. Report 27. Commision of the European Communities. Brussels, Belgium.1992.

GESCHE, Erika; MADRID, Enrique y AGUILA, Cristian. Efecto del pH, cepa bacteriana y tipo de muestra, en la detección microbiológica, de ácido oxolínico y oxitetraciclina en peces. En: Archivos de Medicina Veterinaria. 2001. Vol. 3, No. 1. p. 21-29. ISSN 0301-732X.

GODOY, F.; BUNSTER, M.; MATUS, V.; ARANDA, C.; GONZÁLEZ, B. y MARTINEZ, M. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. En: Letters in Applied Microbiology. 2003. Vol. 36. p. 315-320.

HAJI, J. The distribution of *Physa acuta* Draparnaud (Gastropoda: Physidae) in Malaysia and it's suitability as test material for insecticide toxicity studies. En: Journal of Medicine and Applications Malacology. Vol. 5. p.129-134.

HEINZMANN, Stefan; DIETER, E. y STEIN, T. Engineering *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for improved production of the lantibiotic subtilin. En: Applied Microbiology and Biotechnology. (Jan, 2006). Vol. 69. No. 5.

HOLT, John G.; KRIEG, Noel R.; SNEATH, Peter H.; STALEY, James T. y WILLIAMS, Stanley T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition. Baltimore, Meriland 21202, USA. Editorial Williams & Wilkins. 1994. p. 559.

MAIER, R.M; PEPPER, I.L. y GERBA, C.P. Enviromental Microbiology. Academic Press. San Diego, California. (2000)

MARTINEZ, M.; BAEZA, J.; FREER, J. y RODRIGUEZ, J. Clorophenol Tolerant and degradative Bacteria Isolated From a River Receiving Pulp Mill Discharges. En: Toxicologycal and Environmental Chemistry. Vol. 77. p. 159-170.

MATUS, V.; SANCHEZ, M.A.; MARTINEZ, M. y GONZALEZ, B. Efficient Degradation of 2,4,6-Ticlorophenol Requires a Seto f Catabolic Genes Related to

*tpc* Genes from *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 69. (Dec. 2003), p.7108-7115.

RIVAROLA, V. y BALENGO, H. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on polyamine biosynthesis. En: Toxicology. Vol.68. 1991. p.109-119.

RIVAROLA, V.; MORI, G. y BALENGO, H. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid action on in vitro proteinsynthesis and its relation to polyamines. En: Drug and Chemistry. Toxicology. Vol.15. 1992. p.245-257.

SOLOMON, Keith R.; ANADON, Arturo; CEDEIRA, Antonio L.; MARSHALL, Jon y SANIN, Luz H. Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante la aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente. Informe preparado para la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD), División de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C, Estados Unidos de América. Marzo de 2005.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses, and specific functions. En: Molecular Microbiology. Vol. 56. Issue 4. May, 2005. p.845- 857.

SINGH, S.V. y AWASTHI Y.C. Inhibition on human glutathione S-transferases by 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T). En: Toxicology and Applied Pharmacology. Vol. 81. 1985. p. 328-336

URIBE G, Camilo; MELO, Olga; SALCEDO, Alejandra; CESPEDES, Juan E.; SANTODOMINGO, Tania; GASTELBONDO, Yesid y HERNADEZ, Boris O. Supuestos efectos del Glifosato en la Salud Humana. Bogota, diciembre, 2001.

WORTHING, Charles y WALKER, Barrie. The Pesticide Manual. A World Compendium. Eighth Edition. Published by The British Crop Protection Council. Printed by The Lavenham Press Limited. Great Britain, 1987.

ZOMOZA, Bonilla. Erradicación de cultivos ilícitos en Colombia. Intervención de la dinámica conflictiva. Documento presentado al Congreso Ambiente para la Paz. Guaduas, Colombia.1998.

ZYCHILNSKI, L. y ZOLNIEROWICZ, S. Comparison of uncoupling activities of chlorofenoxy herbicides in rat liver mitochondria. En: Toxicology Letters., Vol. 52. 1996. p.25-34



### **Fuentes electronicas.**

ARIAS, Andrés F. DISCURSO. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. [citado: enero, 2008]. Disponible en la dirección de internet: <[www.minagricultura.gov.co/media/1\\_04703859.pdf](http://www.minagricultura.gov.co/media/1_04703859.pdf)>

BIOLAND. Soluciones Orgánicas con toda la fuerza de la Naturaleza. [online]. Chile. [citado: abril 2007]. Disponible en la dirección de internet: <[www.bioland.cl/nutricompoust-mo](http://www.bioland.cl/nutricompoust-mo)>.

COMUNICACIÓN PROTOCOLO. Gabinete De Comunicación De La Universidad De Salamanca. Patio de escuelas No.1. 37008. [online]. Salamanca. Disponible en la dirección de internet: <[www.usal.es/gabinete/comunicacion/noticia.jsp?id=1253](http://www.usal.es/gabinete/comunicacion/noticia.jsp?id=1253)>

ENRIQUEZ, Pedro. Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. Laboratorio de Ecotoxicología, Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) [online]. Chile. 1997. [citado: de febrero de 2006]. Disponible en la dirección en internet:<<http://www.monografias.com/trabajos10/evaries/evaries.shtml>>

IANNACONE, Jose; CABALLERO, Cecilia y ALVARIÑO, Lorena. EMPLEO DEL CARACOL DE AGUA DULCE *Physa venustula* Gould COMO HERRAMIENTA ECOTOXICOLÓGICA PARA LA EVALUACIÓN DE RIESGOS AMBIENTALES POR PLAGUICIDAS. En: Agricultura Técnica. Vol. 62. No. 2. (abr-jun, 2002). p. 212-225. [online] Chile. 2002. [citado: nov 2006]. Disponible en la dirección de internet: <[www.bioline.org.br/request?at02021](http://www.bioline.org.br/request?at02021)>

INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGIA. Ultima actualización: 18 june 2007 [online]. Delegación Coyoacán, México D.F. [citado: febrero 2007]. Disponible en la dirección de internet: <[www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/download/pytransporte.pdf](http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/download/pytransporte.pdf)>.

MENDIVELSO, Nelly. Glifosato se raja en laboratorio de la UN. Periodico Unimedios. Universidad Nacional de Colombia. Febrero de 2008. Disponible en la direccion de Internet: <[www.unperiodico.unal.edu.co/ediciones/102/07.html](http://www.unperiodico.unal.edu.co/ediciones/102/07.html)>

MONSANTO. Agricultura España. Productos Monsanto. Roundup. España. 2008 [citado: enero 2006]. Disponible en la dirección de internet: <[www.monsanto.es/productos-monsanto/productos-monsanto/roundup/roundup](http://www.monsanto.es/productos-monsanto/productos-monsanto/roundup/roundup)>

NIVIA, Elsa, Boletín de Ecofondo ¡La gestión ambiental comunitaria Avanza! N° 25. p.19-25. Abril-Mayo 2004. [online]. Bogotá, Colombia. [citado: marzo 2006]. Disponible en la dirección en internet: <[www.mamacoca.org/Octubre2004/doc/Ecosistemas\\_Colombianos.htm](http://www.mamacoca.org/Octubre2004/doc/Ecosistemas_Colombianos.htm)>. 2004.

OLIVERA, S y RODRIGUEZ, Iturrealde D. Pesticidas, Salud y Ambiente. Investigadores del Laboratorio de Neurociencia Molecular (PEDECIBA) Departamento de Neurobiología, Instituto Clemente Estable. PEDECIBA. [online] Uruguay. 2002. [citado: febrero 2006]. Disponible en la dirección en internet: <[www.ideas.coop/html/OCTalgodon7.htm](http://www.ideas.coop/html/OCTalgodon7.htm)>.

POZZO A, Maria C; PELLEJERO, Graciela; ASCHNKAR, Gabriela; GIL, Maria I. y ABRAMETO, Mariza. Efecto de los Plaguicidas sobre los Microorganismos del suelo. Su capacidad de Autodepuración en el Valle inferior del Río Negro. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. [online]. Río negro, Argentina. Noviembre de 2004. [citado: febrero 2007] Disponible en la dirección en internet: <[www.inta.gov.ar/valleinferior/info/documentos/rnnp/plaguicidas.pdf](http://www.inta.gov.ar/valleinferior/info/documentos/rnnp/plaguicidas.pdf)>.

RUIZ, Santiago. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación. [online] 2001. Tesis de grado. [citado: marzo 2006]. Disponible en la dirección de internet: <[www.tdx.cesca.es/TESIS\\_UPC/AVAILABLE/TDX-0130102-15958//02\\_introduccion.pdf](http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0130102-15958//02_introduccion.pdf)>

SALUD COLOMBIA, LA REVISTA. Public Health Journal on the Net. Edición, No. 55. Febrero de 2001. [citado: noviembre 2006]. Disponible en la dirección de internet: <[www.saludcolombia.com/actual/salud55/interna55.htm](http://www.saludcolombia.com/actual/salud55/interna55.htm)>

[www.mediatecavipec.com/nutricion/nutricion270106.htm](http://www.mediatecavipec.com/nutricion/nutricion270106.htm)

[www.midiatecavipec.com/nutricion/nutricion110106.htm](http://www.midiatecavipec.com/nutricion/nutricion110106.htm)

[www.biodiversityreporting.org/index.php?pagelD=sub&lang=enUS&currentItem=article&docId=135&a...](http://www.biodiversityreporting.org/index.php?pagelD=sub&lang=enUS&currentItem=article&docId=135&a...)

[www.mtas.es/insht/ntp/ntp143.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp143.htm)

[www.interplagas.com.ar/control-de-plagas.htm](http://www.interplagas.com.ar/control-de-plagas.htm)

[www.sagan-gea.org/hojared\\_AGUA/paginas/11\\_aguab.html](http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/11_aguab.html)

[www.semillas.org.co/articulos.htm?x=30087&cmd%5B111%5D=c-1-21](http://www.semillas.org.co/articulos.htm?x=30087&cmd%5B111%5D=c-1-21) (febrero 2006)

[www.tecnun.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/09ProdQui/111ProbPest.htm](http://www.tecnun.es/Asignaturas/Ecologia/Hipertexto/09ProdQui/111ProbPest.htm)