

## TOXICIDAD DE LOS PRINCIPALES PLAGUICIDAS UTILIZADOS EN EL MUNICIPIO DE POPAYÁN, USANDO *Bacillus subtilis*

### TOXICITY OF THE MAIN PESTICIDES USED IN POPAYÁN VALLEY WITH *Bacillus subtilis*

NEYLA BENITEZ-CAMPO<sup>1</sup>, DILBERT HARLEY VIVAS ZARATE<sup>2</sup>,  
ESTEBAN DAVID ROSERO HERNANDEZ<sup>3</sup>

#### PALABRAS CLAVE:

*Bacillus subtilis*, bioensayo, plaguicida, toxicidad

#### KEY WORDS:

*Bacillus subtilis*, bioassays, pesticide, toxicity.

#### RESUMEN

*En el presente trabajo se evaluó la toxicidad de diez plaguicidas utilizados en el municipio de Popayán-Colombia, empleando la técnica de difusión en disco y como bioindicador Bacillus subtilis, ATCC 6633. Para la evaluación se utilizó la formulación comercial, puesto que se pretende conocer la toxicidad de estos agroquímicos en la presentación que utiliza el campesino. Los resultados mostraron que pueden diferenciarse claramente cuatro grupos de plaguicidas según la magnitud del efecto tóxico; el primero de ellos conformado por el herbicida Combo y los insecticidas Tamaron y Furadan, los cuales no mostraron toxicidad. El siguiente grupo calificado como ligeramente tóxico, compuesto por el insecticida Lorsban con un 42.0% de toxicidad, seguido de los medianamente tóxicos, entre los que se encontró a los herbicidas Tordon, Gramoxone y Roundup, con una toxicidad de 51.6%, 50.5% y 49.0% respectivamente. Finalmente el grupo de los altamente tóxicos, conformado por los fungicidas Manzate, Curzate y Format, con una toxicidad de 79.3%, 69.5% y 63.45% respectivamente. Mediante análisis de varianzas, se estableció que hubo diferencias significativas entre plaguicidas y entre concentraciones ( $p=0.000$ ), y que las diferencias dependen del tipo de plaguicida y de la concentración utilizada, puesto que la interacción plaguicida - concentración fue significativa estadísticamente ( $p=0.000$ ).*

---

Recibido para evaluación: Febrero 6 de 2009. Aprobado para publicación: junio 3 de 2009

1 Bióloga, M.Sc. Microbiología. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle.

2 Biólogo, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Universidad del Cauca.

3 BioloWgo, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Universidad del Cauca.

## ABSTRACT

This research evaluated the toxicity of ten pesticides used in the municipality of Popayan, Colombia, using bioassays with *Bacillus subtilis*, ATCC 6633, employing the disk diffusion method. For this study, was used the commercial formulation, because we want to know toxicity of these agrochemicals in the presentation used by farmer. Results showed that four groups of pesticides according to the magnitude of toxic effect, the first group is composed by Combo, Tamaron and Furadan, insecticides, which showed no toxicity. The second group was lightly toxic, which was Lorsban insecticide with 42% of toxicity followed by moderately toxic, among those are Tordon, Gramoxone and Roundup herbicides, with a toxicity of 51.6%, 50.5% and 49.0% respectively. Finally the group of highly toxic, are Manzate, Curzate and Format fungicides, with a toxicity of 79.3% 69.5% and 63.45% respectively. The analysis of variances, showed a significant differences between pesticides and between concentrations ( $p = 0.000$ ). The differences depends of the type of pesticides and the concentration used, because the interaction pesticide - concentration was significant statistically ( $p = 0,000$ ).

## INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la agricultura, siendo liberados al ambiente en grandes cantidades, sin que se conozca su verdadero efecto tóxico. En la actualidad no es posible una agricultura con altos rendimientos sin la utilización de medidas de protección de las plantas, hoy se concibe el uso de los plaguicidas enmarcados dentro de un manejo integrado de plagas, enfermedades y malezas, lo que obliga a conocer profundamente las propiedades de estos compuestos, sus residuos en los cultivos y en el medio, así como sus aspectos toxicológicos [1]. Estudios sobre la toxicidad de estos compuestos aún dependen extensivamente de la utilización de invertebrados. [2, 3, 4], pero en los últimos años muchas publicaciones han mostrado el desarrollo de métodos alternos en pruebas de toxicidad, en los cuales se explora el uso de métodos rápidos y de bajo costo. [5, 6, 7]. Las bacterias propias del suelo, que están ampliamente distribuidas en la naturaleza y que juegan un papel ecológico muy importante en estos ecosistemas, pueden ofrecer un potencial de amplio uso para desarrollar pruebas de toxicidad; así como la facilidad de su manejo en el laboratorio, al crecer rápidamente permitiendo desarrollar pruebas en tiempos muy cortos y a muy bajo costo. Este es el caso de *Bacillus subtilis*, bacilo Gram-positivo, productor de endosporas, resistentes a la desecación, radicación, altas temperaturas y desinfectantes químicos [8], adicionalmente tiene la capacidad de producir más de

dos docenas de antibióticos con una alta diversidad de estructuras químicas que contribuyen a la sobrevivencia del organismo en su hábitat natural. [9, 10].

En el presente estudio se utilizó a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como bioindicador de toxicidad, con base en las características que le permiten alta adaptación en su hábitat natural y que tiene un potencial no sólo para ser utilizado en ensayos de antimicrobianos, sino en pruebas de toxicidad de pesticidas. Los ensayos de toxicidad incluyen estudios del efecto del compuesto activo, [11, 12, 13], pero poco se ha realizado con la presentación comercial de la mayoría de ellos. El propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto tóxico de los principales plaguicidas utilizados por los campesinos en el municipio de Popayán – Colombia, los cuales son usados en su presentación comercial, que contiene además del ingrediente activo sustancias acompañantes que pueden influir en la toxicidad de cada plaguicida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**SELECCIÓN DE LOS PLAGUICIDAS Y PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES.** Los plaguicidas fueron seleccionados de acuerdo a los registros de mayor venta en las principales casas agrícolas de la ciudad de Popayán (02°26´39" de latitud norte y 76°37´ de latitud oeste). La preparación de las diferentes concentraciones se realizó a partir de las etiquetas de los productos, o

de las recomendaciones de los proveedores, con el fin de hacer el experimento lo más cercano posible a la aplicación que realiza el campesino durante su utilización. La concentración de uso agrícola se denominó 1.0, se preparó una concentración mayor a ésta, denominada 1.5, seguida de dos concentraciones diluidas, denominadas 0.5 y 0.25. (Tabla 1). Cada uno de los plaguicidas se disolvió en una solución de Dimetil Sulfoxido (DMSO) y Glicerol en relación 70:30, solvente que permitió la solubilidad de todos los plaguicidas y que ha sido ampliamente utilizado como solvente en pruebas con microorganismos, ya que no interfiere con su estructura ni actividad bacteriana. [14].

**BIOENSAYO.** Se utilizó *Bacillus subtilis* ATCC 6633, el cual fue inicialmente reactivado tomando una porción de 1 cm<sup>2</sup> de las esporas, contenidas en papel, e 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), esterilizado en autoclave a 121°C y 15 psi. Se incubaron a 35°C por 24 horas y en agitación constante a 130 rpm. Se hicieron 2 repiques adicionales en medio líquido. Se calculó el tiempo de máximo crecimiento, el cual fue alcanzado a las 6 horas de inoculación, momento en el cual la población de *B. subtilis* estuvo alrededor de 2,1x10<sup>6</sup> cel/mL cuya densidad óptica a 620 nm fue de 0.4. [15].

Posteriormente se inocularon 0.5 mL del cultivo en cajas de petri, previamente puestas a 30°C x 8 horas.

**Tabla 1.** Lista de plaguicidas y concentraciones utilizadas en el Bioensayo

FORMULADO COMERCIAL (INGREDIENTE ACTIVO)	Tipo de plaguicida	CONCENTRACIONES (mL/L o g/L)			
		1.5	Uso agrícola (1.0)	0.5	0.25
Roundup (Glifosato 48%)	Herbicida	7.5	5.0	2.5	1.25
Gramoxone SL (Paraquat 20%)	Herbicida	2.25	1.5	0.75	0.375
Tordon 101 SL (2,4-D 24% + Picloran 6%)	Herbicida	9.0	6.0	3.0	1.5
Combo (Picloran 240g/L + Metsulfuron 600 g/kg)	Herbicida	18.75	12.5	6.25	3.125
Furadan 3SC (Carbofuran 33%)	Insecticida	1.5	1.0	0.5	0.25
Tamaron SL (Metamidofos 48%)	Insecticida	1.875	1.25	0.625	0.312
Lorsban 4EC (Clorpirifos)	Insecticida	1.87	1.25	0.625	0.312
Manzate 200WP (Mancozeb 80%)	Fungicida	7.5	5.0	2.5	1.25
Curzate M-8 (Cymoxanil 8% + Mancozeb 64%)	Fungicida	3.75	2.5	1.25	0.625
Format WP (Propineb 700 g/kg)	Fungicida	3.0	2.0	1.0	0.5

Se procedió a ubicar al azar 4 discos de papel filtro Whatman, impregnado con 7μL de los plaguicidas a las diferentes concentraciones seleccionadas (Tabla 1). En otra caja, se ubicaron dos discos, uno como control negativo, compuesto por el solvente DMSO + Glicerol y el otro como control positivo compuesto por Oxitetraciclina más el solvente. Se hicieron cuatro repeticiones de cada plaguicida y de sus respectivas concentraciones. Las cajas fueron incubadas a 35 °C por 18 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la toxicidad de cada plaguicida, al medir el diámetro de los halos de inhibición alrededor de cada disco con plaguicida y se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo. [16].

**DISEÑO EXPERIMENTAL.** Para la realización de las pruebas se aplicó un diseño completamente al azar con estructura factorial, en el cual la unidad experimental fue el cultivo bacteriano dentro de la caja de Petri. Para el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), para el análisis de varianza se uso la tabla ANOVA y para las comparaciones entre tratamientos se uso la prueba de Tukey, con una significancia del 5%.

## RESULTADOS

**PRUEBA DE TOXICIDAD.** Se observó que siete de los diez plaguicidas evaluados, presentaron toxicidad sobre

*B. subtilis* ATCC 6633. Destacándose los fungicidas, por su mayor toxicidad, en donde el Manzate presentó los mayores halos de inhibición en todas las concentraciones, seguido del Curzate y Format (Figura 1), correspondiente a un efecto inhibitorio con respecto al control positivo del 79.3, 69.5 y 63.4% respectivamente. En cuanto a los herbicidas estos presentaron en general un tamaño de halo menor que los fungicidas, no observándose diferencia significativa entre ellos, reflejándose en el efecto inhibitorio del 51.6, 50.5 y 49.0% para el Tordon, Gramoxone y Roundup, respectivamente. Como se observa en las Figuras 1 y 2, el Tordon y el Roundup, mostraron un comportamiento muy similar, con una ligera tendencia a aumentar la toxicidad al incrementar la concentración.

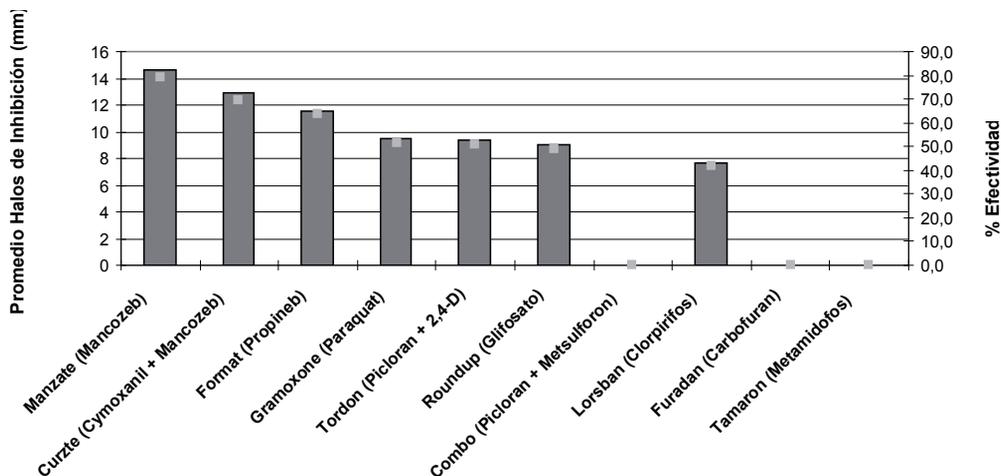
Mientras que el Gramoxone presentó un aumento notable de la toxicidad a la mayor concentración. El Combo fue el único herbicida que no produjo toxicidad sobre *B. subtilis*.

El Lorsban fue el único insecticida que presentó toxicidad, sus halos de inhibición fueron los más pequeños, con un efecto inhibitorio del 42%, observándose diferencias significativas con respecto a los otros plaguicidas. Por el contrario el Tamaron y Furadan no mostraron toxicidad.

Mediante análisis de varianza se estableció que hubo diferencias significativas entre plaguicidas ( $p=0,000$ ) y entre concentraciones ( $p=0,000$ ). No obstante las diferencias entre plaguicidas fueron dependientes de la concentración, es decir que existe una relación entre el tipo de plaguicida y la concentración utilizada ( $p=0,000$ ). El modelo usado explica el 85.5% de la variación del diámetro, esto significa que durante el trabajo experimental se controlaron, en buena forma, factores de ruido que pudieran incidir en los resultados del diseño experimental. Cuadro 2.

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN.** Por análisis de comparaciones múltiples de Tukey con  $\alpha=0.05$ , se determinó que la concentración más tóxica fue la de 1.5 para todos los plaguicidas, pero que este efecto puede variar dependiendo del plaguicida utilizado. Es así como, en el Manzate las concentraciones de 1.0 y 1.5 no presentaron diferencias significativas entre ellas, siendo por lo tanto, considerada la concentración de uso agrícola (1.0), de alta toxicidad. (Figura 2). El Format, Tordon, Roundup y Lorsban mostraron el mismo comportamiento, es decir que la concentración agrícola fue tan tóxica como la de 1.5, aunque la magnitud de la toxicidad fue disminuyendo en cada uno de ellos. Para el Curzate, la concentración de uso agrícola fue menos tóxica que la de 1.5, pero no mostró diferencia signifi-

**Figura 1.** Diámetro promedio de los halos de inhibición producidos por los plaguicidas y porcentaje del efecto inhibitorio con respecto al control positivo.

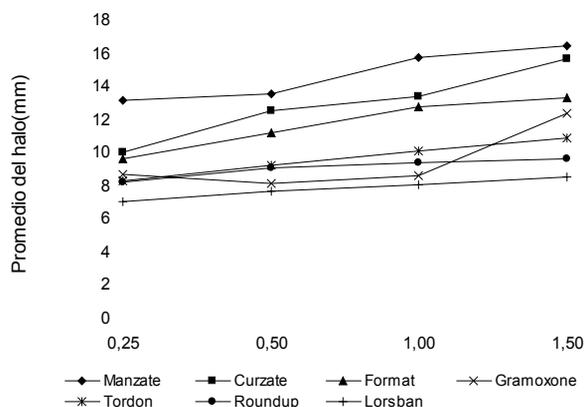


**Cuadro 2.** Análisis de varianzas

FV	g.l.	SM	CM	F	P-value
Plaguicida	6	2271.81	378.63	306.2353	0.00
Concen	3	593.1	197.7	159.8976	0.00
Plaguicida *Concen	18	203.35	11.3	9.1369	0.00
Residuales	420	519.29	1.24		
Total	447	3587.55			

$$R^2 = 0.855$$

**Figura. 2** Diámetro promedio de los halos de inhibición vs. concentración de los plaguicidas evaluados.



cativa con la de 0.5. A pesar de que en el Gramoxone la mayor toxicidad fue a la concentración de 1.5, presentó un comportamiento diferente, con respecto a los otros plaguicidas, la concentración de uso agrícola (1.0) no fue significativamente diferente de las concentraciones menores. Por otro lado, el Tordon, Roundup y Lorsban mostraron también un comportamiento interesante en cuanto al efecto de la concentración, encontrándose que la de uso agrícola no difiere de la de 1.5 y a su vez, ésta última no difiere significativamente de la de 0.5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, teniendo en cuenta el blanco de acción toxica de cada plaguicida, se encontró que los fungicidas fueron los más tóxicos, destacándose el Manzate, formulado comercial que

contiene 80% de Mancozeb como ingrediente activo (i.a), que es también el mismo del Curzate, (64%). A su vez tiene similitud con el Format cuyo principal i.a es el Propineb (700 g i.a/kg). Al comparar la composición química de estos dos i.a., se puede inferir que tienen la misma acción sistémica al trabajar con los iones zinc, 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 éste en la célula, volviéndose tóxico en dosis elevadas, ya que actúa como cofactor en muchos procesos metabólicos mediados por enzimas. Dicho efecto es corroborado por investigaciones en las que se observó disminución de la luminiscencia bacteriana y del crecimiento de *Colpidium* cuando estos fueron sometidos a concentraciones bajas de ditiocarbamatos de cobre. [17]. Se observó también en el control de microorganismos patógenos del tracto digestivo del cerdo, donde se tratan estas infecciones utilizando zinc entre 160-180 ppm, en acción conjunta con antibióticos, las cuales arrojaron resultados positivos contra la infección bacteriana. [18].

Por lo dicho anteriormente se puede inferir que el zinc es el responsable de la toxicidad causada por estos plaguicidas a *B. subtilis* y que los fungicidas se ubiquen en el grupo más tóxico en este trabajo. Por otra parte el cymoxanil compuesto acompañante del Mancozeb en el formulado Curzate, no aumentó la toxicidad de este plaguicida, pues parece haber sido utilizado por el microorganismo para su crecimiento, según los resultados obtenidos con una cepa de *Botrytis cinerea*, en donde

muestra que ocurre una biotransformación del cymoxanil en diversos metabolitos los cuales fueron rápidamente metabolizados por el microorganismo. [19].

Con respecto a los herbicidas evaluados, que presentaron una toxicidad media, es necesario considerar que en el caso del glifosato, este ha sido calificado como "fuertemente" irritante o "extremadamente" irritante, [20], en otras investigaciones 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 *Salmonella*. [21]. También se ha reportado daño al DNA en ensayos in vitro en tejidos y órganos de ratón [22]. Sin embargo el glifosato es considerado biodegradable, lo que puede indicar que fue utilizado por *B. subtilis* como nutriente inicialmente y luego transformado en otros metabolitos que al ser tóxicos pudieron disminuir su crecimiento, pero siendo menos letales que los fungicidas evaluados. [23, 24].

Por otro lado, el Combo fue el único herbicida que no mostró toxicidad, compuesto por metsulfuron-metil (600 g i.a./kg) y picloram (240 g i.a./L), este último es también uno de los ingredientes activos del Tordon, que a diferencia del Combo, mostró toxicidad, muy posiblemente este efecto se deba a la presencia del 2,4-D (24%), ingrediente acompañante del picloram en el formulado Tordon, el cual ha demostrado en diversas investigaciones, su alta toxicidad al causar 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. [25, 26, 27, 28, 29].

Con respecto a los insecticidas, se observó que no presentaron toxicidad frente a *B. subtilis* a excepción del Lorsban cuyo efecto inhibitorio fue del 42%, siendo el menos tóxico de los plaguicidas que mostraron toxicidad. A pesar de que el Lorsban, (Clorpirifos 44.45 p/p) y Taron (Metamidofos 48%) pertenecen al mismo

grupo químico de los organofosforados y en los que la toxicidad se basa en la inactivación de la colinesterasa, los plaguicidas mostraron resultados diferentes; el Lorsban produjo halos de inhibición, caso contrario al Furadan (Carbofuran 33%) y Taron que no presentaron ningún nivel de toxicidad sobre *Bacillus subtilis*. Es posible que el clorpirifos cuya estructura química posee un anillo aromático con halógenos como el Cl sea más estable por su alta electronegatividad lo que conlleva a una posible mayor toxicidad, al compararlo con los otros dos ingredientes activos de los insecticidas. [30].

## CONCLUSIONES

Se pueden diferenciar claramente cuatro grupos de plaguicidas, según el grado de toxicidad observado. El primero, conformado por los insecticidas Taron (Metamidofos), Furadan (Carbofuran) y el herbicida Combo (Picloram + Metsulfuron metil), los cuales no mostraron toxicidad. El siguiente, considerado como ligeramente tóxico, en el que se incluyó el insecticida Lorsban, (Clorpirifos) con un efecto inhibitorio del 42.0%. El tercer grupo, integrado por los herbicidas: Roundup (Glifosato), Gramoxone (Paraquat) y Tordon (Picloram + 2,4-D), los cuales presentan un efecto medianamente tóxico, (49.0, 50.5 y 51.6%, respectivamente). Por último, el grupo de los fungicidas: Format, (Propineb), Curzate (Cymoxanil + Mancozeb) y Manzate (Mancozeb), los cuales mostraron el mayor efecto inhibitorio y calificados como altamente tóxicos, con un porcentaje de 63.4, 69.5 y 79.3% respectivamente.

Mediante las observaciones realizadas y el análisis estadístico de los resultados, es evidente que la mayor toxicidad se observó a la concentración de 1.5, pero que ésta fue igualmente tóxica a la de uso agrícola en el Manzate, Format, Tordon, Roundup y Lorsban. Que en el Tordon y Roundup la concentración de uso agrícola fue igualmente tóxica a la de 0.5. Mientras que en el Lorsban la concentración usada por el campesino presentó similitud con la de 1.5 y 0.5. Por otra parte, en el Gramoxone la toxicidad fue igual en las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1.0.

El comportamiento observado indica que se requiere un manejo cuidadoso en la preparación de los plaguicidas, al ser utilizados por el campesino, debido a que la concentración de uso agrícola fue altamente tóxica en la mayoría de los casos, sugiriendo que pueden utilizarse estos agroquímicos a concentraciones menores sin disminuir su efectividad, pero produciendo un menor impacto negativo en el ambiente.

Este estudio sugiere la utilidad de *B. subtilis* ATCC 6633 en pruebas de toxicidad de plaguicidas, en las que se pueden utilizar este tipo de microorganismos los cuales son de fácil manejo en el laboratorio y de bajo costo, así como una alta confiabilidad en los resultados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al profesor Miguel Martínez de la Universidad de Concepción Chile por donación de la cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y por su colaboración en la implementación de la metodología. A las profesoras Martha Páez, y Lizbeth Correa de la Universidad del Valle, por sus valiosos comentarios durante el desarrollo del trabajo. A la Universidad del Cauca por su apoyo logístico.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] FAO. Guidelines for integrated control of rice insect pests. Plant Production and Protection Paper; (1979). No.14. p.115.
- [2] GUILHERMIRO, L., *et al.* Comparative study between the toxicity of 3,4-cichloroaniline and sodium bromide with 21-day chronic test and using tactate dehydrogenase activity of *Daphnia magna* straus. Chemosphere. No. 28. (1994). p.2021-2027.
- [3] GUILHERMIRO, L. *et al.* Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion and acute tests with *Daphnia magna*. Chemosphere. No. 32. (1996). p.727-738.
- [4] GUILHERMIRO, L. *et al.* A *Daphnia magna* first brood chronic test: an alternative to the 21-day chronic biosay. Ecotoxicol. Environ. Safety. No. 42. (1999). p.67-74.
- [5] RIBEIRO, I. Test as a model for assessing the toxicity of the fungicides Penconazol, Cymoxanil and Dichlorofluanid. Chemosphere. No. 41. (2000). p.1637-1642.
- [6] GUIDA, M., INGLESE, M. and MERIC, S. A multi-battery toxicity investigation on fungicides. Desalination. No. 226 (2008). p.262-270.
- [7] HUSSAIN, M.M. *et al.* Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. Pesticide Biochemistry and Physiology. No. 90. (2008). p.66-70.
- [8] HOLT, J. G. *et al.* Berge's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed. Baltimore, Maryland 21202, USA. Editorial Williams & Wilkins. (1994). p.559.
- [9] STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses, and specific functions. En: Molecular Microbiology. Vol. 56. Issue 4. (May, 2005). p.845- 857.
- [10] HEINZMANN, S., DIETER, E. and STEIN, T. Engineering *Bacillus subtilis* ATCC 6633 for improved production of the lantibiotic subtilin. Applied Microbiology and Biotechnology. Jan, Vol. 69. N<sup>o</sup> 5. (2006).
- [11] MENG-CHENG, W. *et al.* Impacts of 5methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry. No. 40. (2008). p.778-788.
- [12] HUMBERT, S. *et al.* Toxicity assessment of the main pesticides used in Costa Rica Agriculture, Ecosystems and Environment. No. 118. (2007). p.183-190.
- [13] ZHANG, Y-H. *et al.* Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67. Ecotoxicol. Environm. Safety. No. 49. (2008). p.1-9.
- [14] EPA. Healt effects test guidelines OPPTS 870.5100. Bacterial reverse mutation test. August (1998). 11pp.

- [15] LIU, D. et al. A Four-Hour Agar Plate Method for Rapid Toxicity Assessment of Water-Soluble and Water-Insoluble Chemicals. National Water Research Institute. Environ Toxicol. and Water Quality, and International Journal. No. 6. (1991). p.437-444.
- [16] MARTINEZ, M.L y MOLINA, N. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (Guayaba). Rev Cubana de Plant Med. 2(1). (1997). p.12-14.
- [17] VASSEUR, P. et al. Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. Chemosphere. 17(4). (1998). p.767-782.
- [18] RODRIGUEZ, M. L. y RIOPEREZ, J. Tecnología. Portal avícola, porcícola y alimentos balanceados. Midia digital, S.C. México. (2005).
- [19] TELLIER, F. et al. Activity and metabolism of cyano-oxime derivatives ins various strains of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochem. and Physiol. No. 78. (2004). p.151-160.
- [20] NIVIA. G. E. Mujeres y plaguicidas. Una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. RAPALMIRA ECOFONDO . PAN. (2000). 113 pp.
- [21] COX, C. Glyphosate. Part 2: Human exposure and ecological effects. Journal of Pesticides Reform. Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR. USA. 15(4). (Winter, 1995).
- [22] CHICANGANA, C y URIBE, N. Evaluación de los efectos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos in vivo del roundup (glifosato) mediante la prueba de letales dominantes en ratón (*Mus musculus*). Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación. Area de genética. (2006).
- [23] BALTHAZOR, T and HALLAS, L.E., Glyphosate degrading microorganisms from industrial activated sludge. Applied Environment Microbiology. Fe. (1986). p.432-434.
- [24] ARBELI, Z y FUENTES, C.L. Acelerated biodegradation of pesticides: A review of the phenomenon, its basis and posible solutions; and a discusion on the tropical dimension. Crop Proct. 10.1016/j.cropro. (2007).
- [25] GODOY, F. et al. Poly- $\alpha$ -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. Letters in App. Microbiol. No. 36. (2003). p.315-320.
- [26] SINGH, S.V. y AWASTHI, Y.C. Inhibition on human glutathione S-transferases by 2,4,5-trichlorophenoxyacetate (2,4,5-T). Toxicol. and App. Pharm. No. 81. (1985). p.328-336.
- [27] RIVAROLA, V. y BALENGO, H. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid effects on polyamine biosynthesis. Toxicology. No. 68. (1991). p.109-119.
- [28] RIVAROLA, V., MORI, G. and BALENGO, H. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid action in vitro protein synthesis and its relation to polyamines. Drug and Chemistry. Toxicology. No.15. (1992). p.245-257.
- [29] ZYCHILNSKI, L. y ZOLNIEROWICZ, S. Comparison of uncoupling activities of chlorofenoxy herbicides in rat liver mitochondria. Toxicology Letters. No. 52. (1996). p.25-34.
- [30] MAIER, R.M., PEPPER, I.L. and GERBA, C.P. Enviromental Microbiology. Academic Press. San Diego, California. (2000). 585 pp.