

BIOSEGURIDAD DE CEPAS NATIVAS DEL HONGO *Trichoderma* spp. UTILIZADAS EN CONTROL BIOLÓGICO

BIOSAFETY OF NATIVE STRAINS OF *Trichoderma* spp. FUNGUS USED FOR BIOLOGICAL CONTROL

Marleny Vargas¹ y Jenny Dussán²

Resumen

El género *Trichoderma* ha sido reportado en el mundo como controlador de hongos fitopatógenos (*Pythium*, *Rhizoctonia solani* (Kuhn), *Sclerotium rolfsii* (Saccardo), *Fusarium solani*, *Alternaria solani*, *Dreschlera avenae*, *D. sorokiniana* y *Sclerotinia sclerotiorum*) en diferentes cultivos. En Colombia se está implementando su uso a nivel comercial para el biocontrol de diferentes hongos fitopatógenos en cultivos de algodón, flores, tomate y frijol. Sin embargo, no se ha hecho una adecuada gestión de riesgo para el hombre, los animales y el ambiente en general. El Ministerio de Salud adoptó los lineamientos que la *Environmental Protection Agency* (EPA) de Estados Unidos ha establecido para los plaguicidas de origen biológico. En este sentido se elaboraron las pruebas de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad agudas o de nivel I (sistémica, oral y pulmonar en ratones; irritación dérmica y ocular en conejos) con tres especies de *Trichoderma* (*hamatum*, *koningii* y *viride*) utilizadas en control biológico. Bajo las condiciones del experimento las cepas no se consideran infectivas ni irritantes pero sí patógenas oportunistas. En la prueba sistémica causaron en los ratones pérdida de peso, peladura de la piel, nódulos intraperitoneales, alteración del comportamiento y afección de órganos. Finalizadas las pruebas intraperitoneal, oral y dérmica se recuperó el hongo.

Palabras clave: pruebas de toxicidad, control biológico, *Trichoderma hamatum*, *T. koningii*, *T. viride*.

Abstract

The genus *Trichoderma* has been reported to worldwide as a controller of phytopathogenic fungus (*Pythium*, *Rhizoctonia solani* (Kuhn), *Sclerotium rolfsii* (Saccardo), *Fusarium solani*, *Alternaria solani*, *Dreschlera avenae*, *D. sorokiniana* and *Sclerotinia sclerotiorum*) in cultivations different. Colombia have had increased the biocontrol in commercial use for phytopathogenic fungus in cotton, flowers, tomato and bean cultivations. Also though, it hasn't been perform an appropriate risk management that it may have on humans, animals and the environment. The Department of Health has adopted the USA *Environmental Protection Agency* (EPA) test, established for biological pesticides. In this way were developed the acute toxicity, infectivity and/or pathogenicity test or level I (systemic, oral and pulmonary in mice; skin irritation and eye irritation in rabbits) with three strains of *Trichoderma* (*hamatum*, *koningii* and *viride*) used for biological control. Under the experimental conditions used, the species were not be considered infectious and irritating but opportunistic pathogenic to mice with sistemic test. The mice showed to lost on weight, skin peeling, intraperitoneal nodule, behavior alteration and organ affection. The fungus was recovered when the systemic, oral and skin test finished.

Key words: toxicity testing, biological control, *Trichoderma hamatum*, *T. koningii*, *T. viride*.

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha incrementado el uso de controladores biológicos de plagas en agricultura, como un componente del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. El género *Trichoderma* (Deute-

romycotina-Hyphomycetes) ha sido reportado en el mundo como controlador de diversos hongos fitopatógenos: *Pythium*, *Rhizoctonia solani* (Kuhn), *Sclerotium rolfsii* (Saccardo), *Fusarium solani*, *Alternaria*

Recibido: enero de 2001; aprobado para publicación: diciembre de 2001.

¹ E-mail: mar_varg@hotmail.com.

² Profesora Asociada, Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC), Universidad de los Andes, Bogotá. E-mail: jdussan@uniandes.edu.co.

solani, *Dreschlera avenae*, *D. sorokiniana* y *Sclerotinia sclerotiorum* en diferentes cultivos (Irmscher *et al.*, 1978; Cook y Baker, 1983; Elad *et al.*, 1983; Nelson *et al.*, 1988; Alippi y Mónaco, 1990; Cotes, 1993; Chet, 1994; Benjumea, 1996; Grondona *et al.*, 1997).

En Colombia se está implementando su uso a nivel comercial para el control de diferentes hongos fitopatógenos en cultivos de algodón, flores, tomate y fríjol. Sin embargo, no se ha hecho una adecuada gestión de riesgo para el hombre, los animales y el ambiente en general. Por tanto, es necesario realizar los estudios de bioseguridad y determinar o descartar sus posibles efectos negativos para el hombre, los animales y el ambiente.

El género *Trichoderma* se considera como un raro patógeno en humanos (oportunista). Se han identificado cinco especies como agentes etiológicos de enfermedad en el hombre: *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibranchiatum* y *T. pseudokoningii*, los cuales ocasionan diferentes afecciones: peritonitis, infecciones en receptores de transplantes, hematomas perihepáticos, afección traumática en el cerebro, absceso cerebral, enfermedades diseminadas, sinusitis invasiva, alveolitis extrínseca alérgica y asma. Estas afecciones se han presentado principalmente en pacientes inmunocomprometidos, algunos con implantes de elementos extraños al cuerpo que representan un importante factor de predisposición a las infecciones oportunistas (Robertson, 1970; Escudero *et al.*, 1976; Loepky *et al.*, 1983; Ragnaud *et al.*, 1984; Jacobs *et al.*, 1992; Halpin *et al.*, 1994; Gautheret *et al.*, 1995; Seguin *et al.*, 1995; Tanis *et al.*, 1995; Guiserix *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1997; Furukawa *et al.*, 1998; Richter *et al.*, 1999).

En un estudio realizado por Hjortkjaer *et al.* (1986) se encontró a *T. reesei* patógena sobre animales blancos de laboratorio (cobayos, conejos albinos y ratones), con inmunodeficiencia inducida, que produjo la muerte a varios de los ejemplares y diferentes anomalías en los que sobrevivieron: en los cobayos, neumonía intersticial, inflamación granulomatosa y necrosis en el hígado; en conejos, abscesos peritoneales, bronconeumonía crónica y lesiones crónicas en los riñones e inflamación granulomatosa; en ratones, Petequias, induraciones y quistes en los riñones,

necrosis en el hígado, inflamación granulomatosa y abscesos abdominales.

Se han desarrollado las guías para los Agentes Microbianos Controladores de Plagas (MPCAs), ya que, a diferencia de los pesticidas químicos, los MPCAs pueden sobrevivir, reproducirse en el ambiente e infectar o causar enfermedad en otros organismos vivos. En este sentido, el Ministerio de Salud expidió el Decreto 1843 de 1991, ley marco sobre plaguicidas. Para los de origen biológico, adoptó los lineamientos que la Environmental Protection Agency (EPA) (1996) ha establecido para este ítem e incluye toxicidad, infectividad y/o patogenicidad (Economicam European Communities, EEC, 1995; EPA, 1996; Ministerio de Salud, 1996).

La EPA ha establecido cuatro niveles de seguridad. En este estudio se elaboraron las pruebas de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad agudas o de nivel I [sistémica (intraperitoneal), oral, inhalación pulmonar, dérmica y ocular] con el fin de establecer si las cepas *T. hamatum* (Th-17), *T. koningii* (Th-11) y *T. viride* (Th-3), usadas en control biológico, representan algún riesgo para la salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con tres cepas nativas de *Trichoderma* utilizadas en control biológico, procedentes del Programa de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades, de Corpoica (*T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*), suministradas por la doctora Alba Marina Cotes (Directora del Laboratorio del Programa). Se hizo un control positivo de infectividad y/o patogenicidad con *Cryptococcus neoformans* cepa LCR-INS.

Para las pruebas intraperitoneal, oral y pulmonar se trabajó con ratones albinos de la cepa C:F:W. de seis a nueve semanas de edad (Hjortkjaer *et al.*, 1986; EPA, 1996; Grünig *et al.*, 1997), con rangos de peso para las hembras entre 24 y 27 g y para machos entre 28 y 31 g. (tabla 1). Para las pruebas dérmica y ocular se trabajó con conejos blancos de la raza Nueva Zelanda, de 2.5 meses de edad, con peso entre 2 y 2.5 kg (Prince, 1964; Gelatt, 1981). Se inocularon 36 conejos (18 por prueba), mitad hembras y mitad machos.

Tabla 1. Pruebas de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad del nivel I en ratones

Intraperitoneal							
Dosis única				Controles			
Microorganismo activo				Microorganismo inactivado		Sin tratamiento	
3 hembras		3 machos		3 hembras		3 machos	
Oral							
Dosis única				Controles			
Microorganismo activo				Microorganismo inactivado		Sin tratamiento	
6 hembras		6 machos		3 hembras		3 machos	
				AC*		C**	
				AC*		C**	
Pulmonar							
Dosis única				Controles			
Microorganismo activo				Microorganismo inactivado		Sin tratamiento	
8 hembras		8 machos		3 hembras		3 machos	
				2 hembras		2 machos	
				2 hembras		2 machos	

* = autocontrol. Controles alojados con los ejemplares inoculados con el microorganismo activo.

** = control.

Preparación del inóculo. Se confirmaron las especies y se trabajó con tres tipos de inóculo, uno activo y dos controles (uno con inóculo inactivado y uno sin microorganismo). Se cultivaron con el método convencional en PDA (agar-papa-dextrosa) más cloranfenicol 0.05 g/ml. Se sembraron también a 37 °C. Se inactivó parte del inóculo por medio de calor al baño María. Para las pruebas intraperitoneal, oral, pulmonar y ocular, los conidios fueron removidos por inundación del medio de cultivo con agua destilada estéril y raspado de la superficie. La suspensión de conidios se homogenizó agitándola en vórtex durante un minuto y se hizo su recuento en una cámara de Neubauer. Para la prueba dérmica el inóculo se removió por raspado de la superficie, se recogió en papel de aluminio estéril y se pesó.

Dosis. Se siguieron las indicaciones de EPA (1996) y se establecieron las dosis para las diferentes pruebas, así: intraperitoneal 0.1 ml (concentración 10^8 conidios), oral 2.0 ml por 100 g de peso corporal (concentración 10^8 conidios), pulmonar 300 µl por 100 g de peso corporal (concentración 10^8 conidios), dérmica 2.0 g por kg de peso corporal (conidios y micelio), ocular 0.1 ml, con una concentración de 10^8 conidios. La concentración de la dosis se equipara con la máxima esperada del pesticida en el medio ambiente, inmediatamente después de la aplicación (Hall *et al.*, 1982; EPA, 1996).

Pruebas, duración y registro de datos. El inóculo se suministró así: para la sistémica, por inyección

intraperitoneal; para la oral, por intubación esofágica; y para la pulmonar, intranasalmente (EPA, 1996; Grünig *et al.*, 1997). Se evaluaron durante veintidós días (Hall *et al.*, 1982), con observaciones diarias para las siguientes variables: peso corporal, ojos, salivación, membranas de las mucosas, piel, pelaje, sueño, materia fecal (diarrea), convulsiones, actividad somatomotor, patrones de comportamiento, temblores, coma y muerte. Al finalizar la prueba se realizó el estudio *post-mortem* que incluyó observación macroscópica (pulmones, hígado, riñones y otras lesiones), recuperación del inóculo (siembra en agar-malta, AM), montaje directo (examen en fresco con KOH y tinta azul-negra), para detectar micelio (forma activa) y conidios (persistencia).

Prueba dérmica de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad. Se siguió la metodología propuesta por Hall *et al.* (1982) y Hjortkjaer *et al.* (1986). Se aplicó en el dorso una dosis en forma tópica. Al finalizar la prueba, se tomó una muestra en el sitio inoculado y se hizo siembra masiva en PDA.

Prueba ocular de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad. Se siguió el método Draize modificado por Hall *et al.* (1982) y los parámetros indicados por el Ministerio de Salud (1996). Las pruebas dérmica y ocular se efectuaron durante catorce días.

Análisis de resultados. Se construyeron gráficas de pesos con base en los promedios de cuatro medicio-

nes: prueba t (se hizo con la variable peso a un nivel del 0.05 (5%) de significancia), gráficas de coordenadas radiales, porcentajes y diagramas de Gant.

RESULTADOS

Prueba intraperitoneal de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad

Peso. En la población inoculada con la dosis activa (DA) de *T. hamatum* y *T. koningii* se encontraron

diferencias significativas con la prueba t de Student en el nivel de significancia del 0.05. La DA de *T. viride* afectó a las hembras. La dosis inactivada (DI) de *T. hamatum* afectó hembras y machos, la de *T. koningii* afectó sólo a los machos y la de *T. viride* sólo a las hembras (tabla 2).

Piel. La población afectada presentó peladura de piel. La DA de *T. koningii* la afectó en 83.3%, y la de *T. hamatum* y *T. viride* en 33.3%. La DI de *T. koningii* en 33.3% y de la *T. viride* en 16.6% (tabla 3).

Tabla 2. Distribución "t" para la variable peso de la prueba intraperitoneal *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*

Día	Peso promedio*			Desviación típica			Valores de "t"		
	C**	DA***	DI****	C	DA	DI	C-DA	C-DI	DA-DI
<i>Trichoderma hamatum</i> , hembras									
1	25.8	24.6	24.7	1.00	0.93	0.21	1.2	1.5	-0.1
8	30.1	27.1	29.3	2.25	0.81	1.27	1.8	0.4	-2.1
15	31.8	27.7	28.8	1.64	1.19	1.21	2.9	2.1	-0.9
22	34.1	27.4	30.0	0.86	0.55	1.28	9.2	3.7	-2.7
<i>Trichoderma hamatum</i> , machos									
1	30.3	29.4	29.6	0.70	0.40	0.53	1.6	1.1	-0.4
8	34.6	33.4	34.3	0.85	0.87	0.87	1.9	0.4	-1.5
15	36.8	31.5	34.0	1.54	0.55	1.42	4.5	1.8	-2.3
22	38.6	31.0	33.9	1.33	2.66	1.65	3.6	3.1	-1.3
<i>Trichoderma koningii</i> , hembras									
1	24.0	24.1	23.8	2.25	0.36	0.72	-0.1	0.1	0.5
8	25.9	24.1	26.1	2.21	2.78	1.00	0.7	-0.2	-1.0
15	28.9	26.1	27.6	2.81	1.87	0.42	1.1	0.6	-1.1
22	30.9	25.8	30.4	0.29	0.25	0.51	3.2	0.3	-11.5
<i>Trichoderma koningii</i> , machos									
1	30.2	29.3	29.2	1.95	1.86	0.25	0.5	0.7	0.0
8	32.7	30.0	30.8	1.26	1.32	0.25	2.1	2.2	-0.8
15	36.7	33.4	33.7	2.06	0.55	0.75	2.2	1.9	-0.5
22	39.6	31.8	34.8	2.31	2.06	0.50	3.6	2.9	-2.0
<i>Trichoderma viride</i> , hembras									
1	25.2	25.4	24.9	0.30	1.28	0.85	-0.2	0.5	0.5
8	27.1	23.1	24.7	0.51	1.78	1.37	2.4	2.3	-0.5
15	29.7	24.7	26.4	0.25	1.22	0.10	5.6	17.3	-1.9
22	32.7	24.4	28.8	0.42	1.33	1.12	8.4	4.6	-3.6
<i>Trichoderma viride</i> , machos									
1	30.0	31.0	31.0	1.00	0.00	0.32	-1.4	0.8	1.6
8	32.5	32.2	32.2	1.35	3.70	0.96	0.1	0.6	0.1
15	34.7	35.1	35.1	2.19	1.93	2.37	-0.2	0.0	0.2
22	37.4	34.6	35.6	3.32	0.85	0.87	1.2	0.8	-1.1

v = 4; a = 0.05; C = ± 2.776. Las celdas oscuras indican que hay diferencia significativa.

* = ratones hembras y machos; ** = control sin inóculo; *** = dosis activa; **** = dosis inactivada.

Tabla 3. Resultados *in vivo* de la Prueba intraperitoneal para la población total

Variables	Dosis activa			Dosis inactivada			Control
	<i>T. hamatum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>	<i>T. hamatum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>	Sin inóculo
	Porcentajes						
Piel (peladura)	33.3	83.3	33.3	0.0	33.3	16.6	0.0
Pelaje (erizamiento)	50.0	0.0	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0
Nódulo intraperitoneal	100.0	100.0	50.0	33.3	66.6	0.0	0.0
Actividad somatomotora (hiperactividad)	0.0	0.0	33.3	0.0	83.3	16.6	0.0
Patrón de comportamiento (agresividad)	33.3	33.3	66.6	33.3	50.0	50.0	0.0

Nódulo intraperitoneal. En varios individuos inoculados con las dosis activa (DA) e inactivada (DI) se apreció un "abultamiento" en la parte baja del vientre que se denominó nódulo intraperitoneal, principalmente en los ejemplares inoculados con la DA. Estos nódulos se relacionaron con la peladura de la piel. Se observó, a partir del día 17 en promedio, la caída del pelaje y la piel presentó hiperpigmentación (color café rojizo), o un área necrosada (color oscuro), con un borde elevado eritematoso. Las DA de *T. hamatum* y *T. koningii* afectaron a la población en 100% y las de *T. viride* en 50%. La DI de *T. koningii* afectó a hembras y machos en 66%, al igual que *T. hamatum*. Las DA de *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride* afectaron en mayor porcentaje y severidad a la población (figura 1 y tabla 3).

Pelaje. Se observó erizamiento del pelaje en la población inoculada con *T. hamatum* (50%) (tabla 3).

Actividad somatomotora. La población inoculada con *T. koningii* DI fue afectada (hiperactividad) en 83.3%, y la inoculada con *T. viride* DA y DI en 33.3 y 16.6%, respectivamente (tabla 3).

Patrón de comportamiento. Las tres cepas afectaron el comportamiento de la población (agresividad). La DA de *T. viride* en 66.6%, y las otras especies en 33.3%. La DI de *T. koningii* y *T. viride* en 50% y *T. hamatum* en 33.3% (tabla 3). Las demás variables consideradas (ojos, salivación, membranas de las mucosas, sueño, materia fecal, convulsiones, temblores, coma y muerte) no fueron afectadas.

Post-mortem: análisis macroscópico, microscópico y siembra de órganos. Durante la prueba no se presentó la muerte de ningún individuo (exceptuando el control positivo de infectividad y patogenicidad), por lo que, al finalizarla, se sacrificaron. Se estudiaron pulmones, hígado y riñones y se incluyeron los nódulos.

Nódulo intraperitoneal. Se observaron, además de los detectados superficialmente, nódulos internos de menor tamaño. Se formaron dos tipos de nódulos: unos generalmente blancos, con un punto oscuro de necrosis en el centro, y otros que presentaban un color muy oscuro (necrosis), ambos de consistencia dura semejante a una carnosidad. Se extrajeron y sembraron en agar-malta (AM) más antibiótico (ab). Estos crecimientos anormales estaban fuertemente adheridos a la piel.

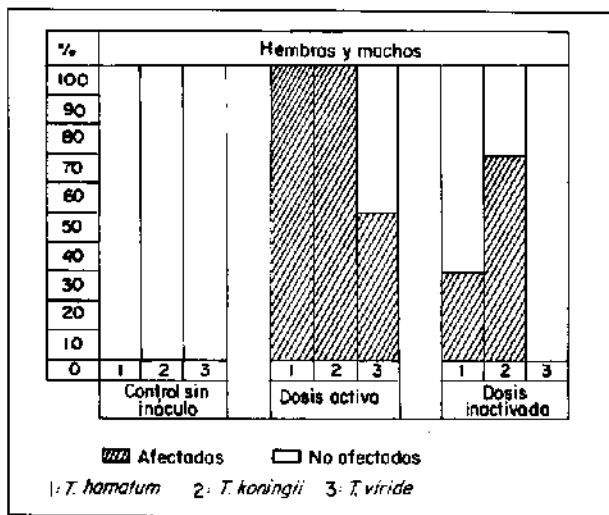


Figura 1. Porcentaje de nódulos intraperitoneales ocasionados en la población de ratones

Las DA y DI de *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride* ocasionaron nódulos tanto externos como internos. Teniendo en cuenta los tipos de nódulos, la DA de

T. hamatum y *T. koningii* afectaron el 100% de la población, y *T. viride* el 83.3%. La DI de *T. koningii* causó mayor afección (83.3%) (tabla 4).

Tabla 4. Resultados *postmortem* de la prueba intraperitoneal para la población de ratones

Variables	Dosis activa			Dosis inactivada			Control
	<i>T. hamatum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>	<i>T. hamatum</i>	<i>T. koningii</i>	<i>T. viride</i>	Sin inóculo
	Porcentajes						
	Nódulo intraperitoneal						
Nódulo externo (presencia)	100.0	100.0	50.0	33.3	66.6	0.0	0.0
Nódulo interno (presencia)	0.0	0.0	33.3	16.6	33.3	33.3	0.0
Conidios (detección)	100.0	100.0	66.6	50.0	83.3	33.3	0.0
Micelio (detección)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Recuperación de cepa (cultivo)	100.0	100.0	66.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	Pulmones						
Recuperación de cepa (cultivo)	66.6	16.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Hígado						
Necrosis	100.0	100.0	66.6	66.6	50.0	83.3	0.0
Descomposición	83.3	66.6	0.0	33.3	0.0	0.0	0.0
Conidios (detección)	0.0	16.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micelio (detección)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Recuperación de cepa (cultivo)	83.3	83.3	16.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	Riñones						
Necrosis	0.0	16.6	0.0	16.6	0.0	0.0	0.0
Descomposición	16.6	33.3	0.0	16.6	0.0	0.0	0.0
Conidios (detección)	83.3	50.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micelio (detección)	16.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Recuperación de cepa (cultivo)	100.0	100.0	16.6	0.0	0.0	0.0	0.0

Montaje directo (observación en fresco). En la mayoría de los montajes se observaron conidios. Se detectó micelio en 66.6% de los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum*, en 33.3 % de los inoculados con *T. koningii* y en 16.6% de los inoculados con *T. viride*. El inóculo se recuperó en el 100% de los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum* y *T. koningii* y en el 66.6% de los inoculados con *T. viride* (tabla 4).

Pulmones. Las cepas inoculadas no afectaron este órgano. En el montaje directo no se detectaron conidios o micelio. La cepa se recuperó de los inoculados con la DA de *T. hamatum* en 66.6% y de la de *T. koningii* en 16.6% (tabla 4).

Hígado. Se observó necrosis (manchas oscuras) en la parte baja de los lóbulos del 100% de los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum* y *T. koningii*, y 66.6% en los inoculados con *T. viride*. La DI de las tres cepas también lo afectaron, y el mayor porcentaje lo ocasionó *T. viride* (83.3%) (tabla 4). También se observó descomposición blanda, la mayoría de las veces en la parte del hígado adjunta a la columna vertebral, ocasionada principalmente por la DA de *T. hamatum* (83.3%) y *T. koningii* (66.6%), y la DI de *T. hamatum* (33.3%) (tabla 4).

Montaje directo. Se detectaron conidios en los inoculados con la DA de *T. koningii* en 16.6% (no se detectó micelio). En los inoculados con la DA de

T. hamatum, *T. koningii* y *T. viride*, éste se recuperó en 83.3% para las dos primeras y en 16.6% para *T. viride*. No se recuperó de los controles sin inóculo y con DI (tabla 4).

Riñones. Ocasionaron necrosis la DA de *T. koningii* y la DI de *T. hamatum* en 16.6%. La descomposición blanda la ocasionaron la DA de *T. hamatum* (16.6%) y *T. koningii* (33.3%), y la DI de *T. hamatum* (16.6%) (tabla 4).

Montaje directo. Se detectaron conidios en los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum* (83.3%) y *T. koningii* (50%). Micelio se detectó en los inoculados con la DA de *T. hamatum* (16.6%). El inóculo se recuperó en el 100% de los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum* y *T. koningii* y 16.6% con *T. viride* (tabla 4).

Prueba oral aguda de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad

Peso. Con la prueba t de Student no se encontraron diferencias significativas en la población inoculada con las dosis activa e inactivada de *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride*.

Materia fecal. Al finalizar la prueba se recuperó el inóculo de la mayoría de los ejemplares inoculados con la DA de *T. hamatum* (5 de 6), *T. koningii* (4 de 6) y *T. viride* (6 de 6). Los demás resultados fueron negativos.

Prueba pulmonar aguda de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad

Peso. Hembras y machos fueron afectados por la DA de *T. hamatum*. Con la prueba t de Student se encontraron diferencias significativas entre el control sin inóculo (C) y la dosis con el inóculo activo (DA) en la última lectura. Las demás variables consideradas durante el experimento no fueron afectadas.

Pruebas dérmica y ocular agudas de toxicidad, infectividad y/o patogenicidad

Los resultados fueron negativos. En siembra masiva de la prueba dérmica se recuperó el inóculo de *T. hamatum* y *T. viride* (50%) y *T. koningii* (67%).

DISCUSIÓN

Prueba intraperitoneal aguda, toxicidad, infección y/o patogenicidad

Las tres especies de *Trichoderma* afectaron a la población de ratones en las condiciones del experimento. Ningún ejemplar falleció durante la prueba, resultado que contrasta con el obtenido en los inoculados con *C. neoformans* LCR-INS (control positivo de infectividad y patogenicidad), en los que falleció 70% de la población, y con el resultado de patogenicidad con *T. reesei*, en el que fallecieron ejemplares inoculados tanto con la DA como la DI (Hjortkjaer *et al.*, 1986).

Peso. El mayor grado de afección en la población lo ocasionó la dosis activa (DA) de las tres especies. Cuando el microorganismo inoculado afecta uno o más órganos altera el sistema fisiológico del animal (Casadevall, 1998) y su peso corporal (Clu, 1991). Adicionalmente, los productos metabólicos de los hongos pueden actuar como antivitaminas, o su presencia puede ocasionar pérdida del apetito, que repercute sobre la salud (Moreau y Moss, 1979).

Piel. La piel de la población inoculada con la dosis activa de *T. hamatum*, *T. viride* y *T. koningii* fue afectada en diferentes porcentajes (*T. koningii*, 83.35; *T. hamatum* y *T. viride*, 33.3%). Esta anomalía estuvo relacionada con los nódulos intraperitoneales. Se observó a partir del día 17 en promedio la caída del pelaje y la piel presentó hiperpigmentación o un área necrosada, con un borde elevado eritematoso. De acuerdo con Rippon (1982), podría catalogarse como una dermatomicosis, similar a la aspergilosis cutánea, que es usualmente secundaria a la diseminación del hongo. Este tipo de afección es ocasionada por hongos oportunistas. En dos casos de infección fatal en pacientes inmunocomprometidos se presentó ulceración de la piel con necrosis ocasionada por *T. pseudokoningii* (Gautheret *et al.*, 1995) y *T. longibranchiatum* (Richter *et al.*, 1999).

Nódulo intraperitoneal. Semeja una fibrosis e induración, la mayoría de las veces con la parte central necrosada, sin contenido visible de pus, aparentemente similar a lo reportado en el artículo

de Muñoz *et al.* (1997), ocasionado por *T. longibranchiatum* en un paciente pediátrico, y al resultado obtenido por Hjortkjaer *et al.* (1986) en ratones y conejos blanco de laboratorio, inoculados con *T. reesei*.

Según Rippon (1982), la respuesta celular a los hongos oportunistas es un proceso necrótico supurativo. La mayoría de las veces la reacción granulomatosa es muy poco organizada. Si el paciente sobrevive, contiene la infección fúngica por formación de granuloma, fibrosis y calcificación. En este caso no se observó supuración; los nódulos se dejaron hasta finalizar la prueba, por lo que no se excluye que se hubiese presentado al comienzo.

Pelaje, actividad somatomotor y patrón de comportamiento. Las afecciones en estas variables (erizamiento, hiperactividad y agresividad) al parecer tendrían que ver con algunos efectos en el sistema nervioso, ya que muchos productos fúngicos son neurotóxicos y pueden tener repercusiones sobre la actividad del sistema muscular (Moreau, 1979). En los reportes sobre los humanos, algunos desarrollaron síntomas neurológicos, como en el caso de una infección fatal ocasionada por *T. pseudokoningii* (Gautheret *et al.*, 1995), una cerebritis focal (Richter *et al.*, 1999), una diseminación fatal ocasionada por *T. longibranchiatum* y abscesos en el cerebro ocasionados por *T. longibranchiatum* (Seguin *et al.*, 1995). Estas anomalías están asociadas al crecimiento del hongo a altas temperaturas (a partir de 35 °C), que a su vez se considera como un factor de virulencia de hongos neurotrópicos (Richter *et al.*, 1999). Las *trichodermas* en estudio crecieron a 37 °C.

Post-mortem: nódulo intraperitoneal. En los análisis directos de la mayoría de la población inoculada con la DA de las tres cepas se observaron conidios; micelio fue visto en algunos de los inoculados con la DA y ésta se recuperó en alto porcentaje. Estos resultados refuerzan los obtenidos en vivo y permiten suponer la patogenicidad de las cepas en estudio. La presencia de conidios indica persistencia del inóculo (Hjortkjaer *et al.*, 1986; EPA, 1996; Muñoz *et al.*, 1997) y la de micelio indica colonización e invasión. Muchos hongos oportunistas son capaces de crecer a la temperatura corporal y toleran el medioambiente de los tejidos (Rippon, 1982). La

recuperación del inóculo indica persistencia y viabilidad (Hjortkjaer *et al.*, 1986; EPA, 1996; Muñoz *et al.*, 1997).

Pulmones. En este estudio no se afectó este órgano. Contrasta con los resultados del experimento con *T. reesei*, en el que se afectaron conejos, cobayos y ratones con bronconeumonía crónica, granuloma, neumonía intersticial, inflamación crónica parcialmente granulomatosa y exudativa (Hjortkjaer *et al.*, 1986). En humanos se han reportado micetomas ocasionados por *T. viride* (Escudero, 1976), nódulos causados por *T. longibranchiatum* (Richter *et al.*, 1999) e infección ocasionada por *T. koningii* (Furukawa, 1998).

Hígado. Fue uno de los órganos más afectados por la DA de las *Trichodermas* inoculadas, observándose necrosis y descomposición. En el estudio de patogenicidad con *T. reesei* (Hjortkjaer *et al.*, 1986), el hígado de los ratones y de los cobayos fue afectado por las dosis activa e inactivada y se produjo inflamación crónica y parcialmente granulomatosa, necrosis e inflamación exudativa; en el estudio en mención y en éste se detectaron esporas y se obtuvo recuperación del inóculo. En humanos han reportado un hematoma perihepático ocasionado por *T. viride* (Jacobs *et al.*, 1992) y una infección invasiva en el hígado por *T. longibranchiatum* (Muñoz *et al.*, 1997).

Aparte de posible patogenicidad, estos resultados también pueden estar relacionados con micotoxicosis, ya que la DI (inóculo inactivado) afectó también a los animales del estudio. Se considera que este inóculo ayuda a evaluar las propiedades tóxicas de compuestos termotolerantes que puedan estar presentes en el inóculo y que los mecanismos de defensa del hospedero puedan liberar. La micotoxicosis está frecuentemente asociada a efectos en el hígado y los riñones. Los metabolitos elaborados por hongos son frecuentemente hepatotóxicos y nefrotóxicos (Moreau y Moss, 1979).

Riñones. Se detectaron pocas afecciones, pero el inóculo se recuperó en el 100% (*T. hamatum* y *T. koningii*). En el estudio de patogenicidad con *T. reesei* (Hjortkjaer *et al.*, 1986), los riñones de rato-

nes y conejos fueron afectados tanto por la DA como por la DI, con inflamación crónica, parcialmente granulomatosa y exudativa, necrosis, petequias y quistes. Los riñones están ligados a los efectos de la micotoxicosis (Moreau y Moss, 1979).

Es difícil distinguir micosis de micotoxicosis, más aun considerando que los mecanismos de *Trichoderma* involucrados en el control biológico de hongos fitopatógenos tampoco han sido dilucidados y generalmente están implicados varios de ellos. De acuerdo con los resultados de esta prueba, las tres cepas de *Trichoderma* pueden ser consideradas como patógenas, sin que estén muy claros los mecanismos; en el caso de las dosis activas parece que intervinieran la colonización, la diseminación y la acción de enzimas y metabolitos secundarios (estos últimos también en la DI), como los derivados de los péptidos, terpenos, con núcleo de pirona y scirpenos reportados con actividad tóxica y poderosas enzimas líticas como las del producto celuclast (Hou *et al.*, 1972; Irmscher *et al.*, 1978; Brückener *et al.*, 1984; Hjortkjaer *et al.*, 1986; Claydon *et al.*, 1987; Ghisalberti y Rowland, 1993; Huang *et al.*, 1994; Schirmbock *et al.*, 1994; Goulard *et al.*, 1995; Hlimi *et al.*, 1995; Yee, 1995).

La EPA plantea que los microorganismos no pueden atravesar la barrera de la piel o infectar las células epiteliales de un animal saludable, sólo por contacto; por eso hace énfasis en la prueba sistémica, para evaluar los posibles efectos adversos del MPCA una vez haya traspasado la barrera de la piel deliberadamente. En estas condiciones las tres cepas fueron patógenas e incluso se afectó la piel asociada con algunos nódulos.

Se hace énfasis en que estas afecciones se caracterizan como secundarias, es decir, que la entrada de los agentes pudo ser a través de la epidermis lesionada, por la introducción traumática directa al tejido sano por medio de instrumentos quirúrgicos contaminados, prótesis, cánulas, soluciones intravenosas, etc. Una vez en el tejido, de acuerdo con Rippon (1982) y Arango y Castañeda (1995) el hongo puede comportarse como un colonizador o invasor. Algunas especies de *Trichoderma*, incluyendo las de este estudio, han presentado este comportamiento.

Prueba oral aguda: toxicidad, infección y/o patogenicidad

El suministro oral de la dosis no afectó a los animales de la prueba; no obstante, se recuperó inóculo en la materia fecal de los inoculados con la DA, lo que contrasta con el resultado obtenido con *C. neoformans* LCR-INS (control positivo), que afectó el 100% de los inoculados en el comportamiento (pasividad), les ocasionó erizamiento del pelaje y sed constante.

La recuperación del inóculo se puede explicar por diferentes razones. Las especies termotolerantes pueden sobrevivir a la temperatura corporal de los mamíferos; las tres especies de *Trichoderma* crecieron a 37 °C y se inactivaron después de cinco horas a 87 °C, ya que pueden sobrevivir a la temperatura corporal de los mamíferos. *T. koningii* y *T. longibranchiatum* han sido reportadas como especies con buen crecimiento a 32, 35, 40 y 42 °C (Richter *et al.*, 1999). Además se plantea que hongos con propágulos resistentes como clamidosporas, caso que se presenta en *Trichoderma* según Lewis y Papavizas (1983), pueden pasar por el canal alimenticio y ser recuperados en la materia fecal (Moreau y Moss, 1979), como ocurrió en el experimento.

Prueba pulmonar aguda de toxicidad, infección y/o patogenicidad

Peso. La dosis activa de *T. hamatum* afectó a hembras y machos. El resto de variables consideradas no se afectaron; igual resultado se obtuvo con la inoculación de *T. reesei* en ratas (Hjortkjaer *et al.*, 1986). Contrasta este resultado con el del control positivo de *C. neoformans* LCR-INS, el cual ocasionó la muerte del 50% de los ejemplares inoculados.

Pruebas dérmica y ocular aguda de irritación, toxicidad, infección y/o patogenicidad. No se apreció irritación, toxicidad y/o patogenicidad en los ejemplares tratados con la prueba dérmica, a pesar de la persistencia y viabilidad del inóculo, que se recuperó en un buen porcentaje de la población tratada (*T. hamatum* y *T. viride* el 50% y *T. koningii* el 67%), al finalizar la prueba. En la ocular los resultados fueron negativos, pues no se observaron efectos tóxicos inmediatos o de efecto retardado de acuerdo a lo escrito por Grant (1986).

Según los criterios de la EPA (1996) (base de los requerimientos de Ministerio de Salud colombiano), estas cepas no se considerarían infectivas. No hay evidencia de que puedan atravesar o evadir las barreras naturales a la infección que presentan los hospederos saludables (resultados de las pruebas oral y pulmonar), ni irritantes (pruebas dérmica y ocular). Se considerarían patógenas oportunistas que producen infecciones secundarias, es decir, que pueden afectar a los organismos una vez hayan superado por medios indirectos la barrera natural de los tejidos.

El inóculo de *T. hamatum*, *T. koningii* y *T. viride* puede considerarse persistente y viable; se recuperó al finalizar las pruebas agudas intraperitoneal (siembra de órganos), oral (siembra de materia fecal) y dérmica (toma de muestra y siembra).

Por otra parte, los hongos patógenos oportunistas están sujetos a la destrucción por la defensa celular normal del hospedero; una defensa inadecuada, cambios en la flora normal, cambios fisiológicos, etc., permiten que ellos crezcan, colonicen e invadan tejidos. En este caso se necesita mayor tiempo de observación para determinar si la afección es limitada como lo plantea Rippon (1982), o si por el con-

trario se presenta mayor diseminación y se desarrollan más patologías, e incluso se presenta la muerte como ocurrió en varios de los casos clínicos citados y en el estudio realizado por Hjortkjaer *et al.* (1986) con *T. reesei* (que se efectuó durante 57 días).

Según la EPA, si el microorganismo es capaz de infectar los animales de prueba sin provocar signos definitivos de patogenicidad o toxicidad, o se recupera el inóculo al finalizarla, justifica las pruebas subcrónicas, nivel II.

AGRADECIMIENTOS

A María Caridad de García, M. Sc., Profesora Asistente del Centro de Investigaciones Microbiológicas –CIMIC– de la Universidad de Los Andes, por su constante apoyo y sus acertadas y oportunas sugerencias y observaciones; a Fanny Restrepo, M. Sc., Jefe de Investigación en Fitopatología en América Flor Ltda., por su valiosa colaboración y orientación; y a Alba Marina Cotes, Ph. D., Directora del Laboratorio del Programa de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica, quien aportó las cepas de *Trichoderma* trabajadas en este estudio.

REFERENCIAS

- Alippi HE, Monaco C. 1990. Antagonismo *in vitro* entre hongos fitopatógenos y saprófitos de suelos hortícolas. *Rev Argentina de Microbiología* 22:90-93.
- Arango M, Castañeda E. 1995. *Micosis humanas*. CIB e INS, Bogotá. 195 p.
- Benjumea CI. 1996. Control de *Rhizoctonia solani* Kuhn en tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante una combinación de tratamiento de pregerminación controlada y el agente de control biológico *Trichoderma koningii* (Oudemans). Tesis de pregrado, Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias Biológicas, Bogotá. 95 p.
- Brückener H, Graf H, Bokel M. 1984. Paracelsin; characterization by NMR spectroscopy and circular dichroism, and hemolytic properties of a peptaibol antibiotic from the cellulolytically active mold *Trichoderma reesei*. Part B. *Experient* 40:1.189-1.197.
- Casadevall A. 1998. *Cryptococcus neoformans*. AMS Press, Washington D.C.
- Chet I. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol* 48:37-43.
- Claydon N, Allan M, Hanson JR, Avent AG. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans Br Mycol Soc* 88:503-513.
- Chu F. 1991. Conventional toxicity studies. En: Taylor and Francis (eds.). *Basic toxicology fundamentals, target, organs, and risk assesment*. Washington D.C. pp. 77-93; 327-343.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. The American Phytopathological Society Minnesota. 539 p.
- Cotes AM. 1993. Study of common bean protection against damping-off by treatment of sedes with *Trichoderma koningii* Oudemans. Tesis de Ph. D. Faculte des Sciences Agronomiques de Gembloux. Belgique. 121 p.
- Economicam European Communities (EEC). 1995. Council directive of 15 July, 1991, concerning the lacing of plant protection products on the market in biological control: benefits and risks. Cambridge. pp. 283-290.
- Elad Y, Chet I, Boyle P, Henis Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia*. *Phytopathology* 73:85-88.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1996. *Microbial pesticide test guidelines*. Oppts series 885. Grupo C. Government Printing Office. Washington.
- Escudero MR, Pino E, Muñoz R. 1976. Micoma pulmonar causado por *Trichoderma viridae*. *Act Dermosifiliográficas* 67:673-680.

- Furukawa H, Kusne S, Sutton DA, Manez R, Carrau R, Nichols L, Abu-Elnag K, Skedros D, Todo S, Rinaldi MG.** 1998. Acute invasive sinusitis due to *Trichoderma longibrachiatum* in a liver and small bowel transplant recipient. *Clin Infect Dis* 26:487-489.
- Gautheret A., Dromer F, Bourhis JH, Andremont A.** 1995. *Trichoderma pseudokoningii* as a cause of fatal infection in a bone marrow transplant recipient. *Clin Infect Dis* 20:1.063-1.064.
- Gelatt KN.** 1981. *Textbook of veterinary ophthalmology*. Lea & Febiger, Philadelphia. 788 p.
- Ghisalberti EL, Rowland CY.** 1993. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. *J Nat Prod* 56:1.799-1.804.
- Goulard C, Hlimi S, Rebuffat S, Bodo B.** 1995. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot Tokyo* 48:1.248-1.253.
- Grant W M.** 1986. *Toxicology of the eye*. Charles Thomas Publisher, Springfield. 1.083 p.
- Grondona Y, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD, Mote E, Garcia-Acha I.** 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*. a. Biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Appl Environ Microbiol* 63:3.189-3.198.
- Grünig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BWP, Kurup VP, Rennick DM.** 1997. Interleukin-10 is a natural supresor of citokine production and inflammation in a Murine Model of Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 185:1.089-1.099.
- Guiserix J, Ramdane M, Finielz P, Michault A, Rajaona-Rivelo P.** 1996. *Trichoderma harzianum* peritonitis in peritoneal dialysis. *Nephron* 74:473-474.
- Hall RA, Zimmermann G, Vey A.** 1982. Guidelines for the registration of entomogenous fungi as insecticides. *Entomophaga* 27:121-127.
- Halpin DMG, Graneek BJ, Turner-Wauwick M, Newman-Taylor AJ.** 1994. Extrinsic allergic alveolitis and asthma in a sawmill worker: case report and review of the literature. *Occup Environ Med* 51:160-164.
- Hlimi S, Rebuffat S, Goulard C, Dumchamps S, Bodo B.** 1995. Trichorzins HA and MA, antibiotic peptides from *Trichoderma harzianum*. II. Sequence determination. *J Antibiot Tokyo* 48:1.254-1.261.
- Hjortkjaer RK, Bille-Hansen V, Hazelden KP, McConville M, McGregor DB, Cuthbert JA, Greenough RJ, Chapman E, Gardner JR, Ashby R.** 1986. Safety evaluation of cellulast and acid cellulase derived from *Trichoderma reesei*. *Fd Chem Toxic* 24:55-63.
- Hou CT, Ciegler A, Hesseltine CW.** 1972. New mycotoxin, trichotoxin A, from *Trichoderma viride* isolated from southern leaf blight-infected corn. *Appl Microbiol* 23:183-185.
- Huang Q, Tezuka Y, Kikuchi T, Momose Y.** 1994. Trichokomin VI, a new Ca²⁺ channel agonist in bullfrog cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol* 12:271.
- Irmscher G, Boverman G, Bohelm G, Jung G.** 1978. Trichotoxin A-40, a new membrane exciting peptide part A. Isolation, characterization and conformation. *Biochem et Biophys Act* 507:470-484.
- Jacobs F, Byl B, Bourgeois N, Coremans-Pelseneer J, Florquin S, Depre G, Van de Stadt J, Adler M, Gellin M, Thys JP.** 1992. *Trichoderma viridae* infection in liver transplant recipient. *Mycoses* 35:301-303.
- Lewis JA, Papavizas GC.** 1983. Production of chlamydospores and conidios by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media. *Soil Biology and Biochemistry* 15:351-357.
- Loeppyk CB, Sprouse RF, Carlson J.V, Everett P.** 1983. *Trichoderma viridae* peritonitis. *South Med J* 76:798-799.
- Ministerio de Salud.** 1996. *Manual de procedimientos para la evaluación y clasificación toxicológica de sustancias químicas*. Ministerio de Salud, Bogotá. 185 p.
- Moreau C, Moss M.** 1979. *Moulds, toxins and food*. John Wiley & Sons, New York. 477 p.
- Muñoz M, Demmler GL, Travis WR, Ogden AK, Rossmann SN, Rinaldi MG.** 1997. *Trichoderma longibrachiatum* infection in a pediatric patient with aplastic anemia. *J Clin Microbiol* 35:499-503.
- Nelson EB, Harman GE, Nash GT.** 1988. Enhancement of *Trichoderma*-induced biological control of *Pythium* seed rot and pre-emergence damping-off peas. *Soil Biol Biochem* 20:145-150.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS).** 1980. *Criterios de salud ambiental. Principios y métodos para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas*. N° 6, parte I. Servicio de Publicaciones OPS/OMS. México. 279 p.
- Prince JH.** 1964. *The rabbit in eye research*. Charles C. Thomas Publisher, Springfield. 300 p.
- Ragnaud JM, Marceau C, Roche-Bezian MC, Wone C.** 1984. Infection peritonéale a *Trichoderma koningii* sur dialyse péritoneale continué ambulatoire. *Med Malad Infect Dis* 7:402-405.
- Richter S, Cormican MG, Pfaller MA, Lee CK, Gingrich R, Rinaldi MG, Sutton PA.** 1999. Fatal disseminated *Trichoderma longibrachiatum* infection in an adult bone marrow transplant patient: species identification and review of the literature. *J Clin Microbiol* 37:1.154-1.160.
- Rippon JW.** 1982. *Medical mycology*. W B Saunders Company, Philadelphia. pp. 337-341, 683.
- Robertson MH.** 1970. Fungi in fluids: a hazard of intravenous therapy. *J Med Microbiol* 3:99-102.
- Schirmbock M, Lorito M, Wang IL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP.** 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60:4.364-4.370.
- Seguin P, Degeilh B, Grulois I, Acouin A, Maugendre S, Dufour T, Dupont B, Camus C.** 1995. Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:445-448.
- Tanis BC, Van der Pijl H, Van Ogtrop ML, Kibbelaar RE, Chang PC.** 1995. Fatal fungal peritonitis by *Trichoderma longibrachiatum* complicating peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 10:114-116.

Yee A. 1995. Dynamic of an alamethicin by ^{15}N labeling of a fungal peptide: The structure and dynamics of an alamethicin by ^{15}N and ^1H NMR spectroscopy. *Biochem* 31:3.135-3.143.

Young LV, Hertl MC, Murray PR, Jensen J, With H Schorr MW. 1997. Microbial growth inside saline filled breast implants. *Plast Reconstr Surg* 100:182-196.