

Ejercicio para la implementación de un Sistema de Vigilancia Ecotoxicológica para cultivos genéticamente modificados

Beiro O ¹, Domínguez Y ¹, Noa AC ¹, Martínez C ², Valdés J ², Suárez M ², Romay T ², Aguirre E ¹, Prevot V ¹, Lóriga E ¹, Ferrer A ¹, Álvarez R ¹, Díaz D ¹, Quintero Y ¹, Reyes A ¹, Brown E ¹

1. Centro Nacional de Toxicología
2. Oficina de Regulación y Seguridad Biológica

RESUMEN

Introducción: En Cuba se han desarrollado y liberado al medio ambiente variedades de maíz y soya transgénicas que deben monitorearse para lo cual se confecciona un Sistema del Sistema de Vigilancia Ecotoxicológica (SVE) para conocer la necesidad de medidas de respuesta adecuadas, como cambios en las estrategias de gestión de riesgos, medidas de respuesta de emergencia, una nueva evaluación de riesgos o una reevaluación de decisiones. **Objetivo:** Realizar un ejercicio práctico para la implementación del SVE que permita identificar las brechas del sistema. **Materiales y Métodos:** Se seleccionó en Pinar del Río la Empresa Agropecuaria CUBAQUIVIR, en el área se aplicó como método la entrevista para intercambiar información respecto a las características, rotación de cultivos, paquetes tecnológicos, manejo integrado de plagas, estudios de monitoreo previos. Se realizó el muestreo del suelo para investigar sus características biológicas. “In situ” se analizó la fauna asociada al área, las muestras de suelo colectadas se trasladaron al laboratorio para determinar la fauna asociada, la actividad de la comunidad microbiana así como la afectación que pudiese provocar en la lombriz de tierra. **Resultados y discusión:** Los resultados obtenidos corroboraron una menor actividad de la fauna asociada al suelo relacionado con los bajos niveles de materia orgánica, se demostró la factibilidad de la aplicación para la toma de muestra de suelo del procedimiento elaborado dentro del SVE. **Conclusiones:** El ejercicio práctico contribuyó a identificar brechas en la implementación del SVE, mediante las lecciones aprendidas.

Palabras clave: Cultivo Genéticamente Modificado, Sistema de Vigilancia Ecotoxicológica

ABSTRACT

Introduction: In Cuba, transgenic varieties of corn and soybeans have been developed and released into the environment that must be monitored, for which an Ecotoxicological Surveillance System (EVS) is created to determine the need for appropriate response measures, such as changes in prevention strategies, risk management, emergency response measures, a new risk assessment or a re-evaluation of decisions. **Objective:** Carry out a practical exercise for the implementation of the EVS that allows identifying the gaps in the system. **Materials and Methods:** The CUBAQUIVIR Agricultural Company was selected in Pinar del Río, in the area the interview was applied as a method to exchange information regarding the characteristics, crop rotation, technological packages, integrated pest management, previous monitoring studies. Soil sampling was carried out to investigate its biological characteristics. "In situ" the fauna associated with the area was analyzed, the soil samples collected were transferred to the laboratory to determine the associated fauna, the activity of the microbial community as well as the impact that it could cause on the earthworm. **Results and discussion:** The results obtained corroborated a lower activity of the fauna associated with the soil related to the low levels of organic matter, demonstrating the feasibility of applying the procedure developed within the SVE for soil sampling. **Conclusions:** The practical exercise contributed to identifying gaps in the implementation of the EVS, through the lessons learned.

Keyword: Genetically Modified Crop, Ecotoxicological Surveillance System

INTRODUCCIÓN

Los cultivos genéticamente modificados (CGM) están aprobados para uso comercial en varias áreas del mundo. En términos de superficie comercial, la mayoría de estos productos poseen características de tolerancia a herbicidas o protección contra insectos. En cada país previo a la comercialización las autoridades reguladoras someten a una revisión específica los datos de seguridad de cada producto. Dicha revisión permite el registro una vez que las autoridades concluyan que los riesgos eran mínimos o manejables al equipararlos con los beneficios.¹

El monitoreo ambiental posterior al registro de los CGM garantiza la detección y prevención de efectos sobre el ambiente que se deriven del cultivo a mayor escala, es una herramienta para abordar la incertidumbre asociada con la ingeniería genética aplicada a los cultivos, que empleado y regulado adecuadamente, puede contribuir a reducir la inseguridad alimentaria presente y futura.²

El plan de monitoreo post comercialización permite confirmar que las suposiciones en la estimación de riesgo ambiental respecto a la ocurrencia del impacto potencial de efectos adversos de un organismo genéticamente modificado (OGM) son correctas e identificar la presencia de efectos adversos relacionados con su uso tanto para la salud humana y ambiental que no fueron anticipadas en la estimación de riesgo.³ Para cumplir los objetivos antes mencionados el plan de muestreo post mercado emplea el monitoreo caso específico (MCS, del inglés Monitoring Case Specific) y la vigilancia general (GS, del inglés General Surveillance). El monitoreo caso específico solo es requerido para verificar la estimación de riesgo medioambiental, mientras que la vigilancia para identificar los efectos no anticipados.⁴

En Cuba se han desarrollado y liberado al medio ambiente variedades de maíz y soya transgénicas,⁵ que deben monitorearse para lo cual se confecciona un Sistema del Sistema de Vigilancia Ecotoxicológica (SVE) como parte del Proyecto internacional GEF PNUMA “Creación de capacidades adicionales en bioseguridad para la implementación del Protocolo de Cartagena sobre

Seguridad de la Biotecnología en Cuba”, coordinado por la Oficina de Seguridad Ambiental (ORSA), en el que el Centro Nacional de Toxicología (CENATOX) interviene en la determinación de los efectos adversos de los CGM que se liberan al medioambiente. El propósito de la investigación es realizar un ejercicio práctico que permita identificar las brechas del sistema en su implementación.

MATERIALES Y METODOS

Localidad seleccionada a muestrear

Se seleccionó en Pinar del Río la Empresa Agropecuaria CUBAQUIVIR, ubicada en la llanura sur de Pinar del Río, en el Municipio Los Palacios, en el kilómetro 2 ½ de la carretera a Paso Quemado. En el área se aplicó como método la entrevista para intercambiar información respecto a las características, rotación de cultivos, paquetes tecnológicos, manejo integrado de plagas, estudios de monitoreo previos. En la Empresa se contaba con un área de cinco hectáreas que fueron cultivadas con anterioridad para la obtención del híbrido HAme-15.⁶

Estructura del plan de muestreo

Características generales: El objetivo del muestreo fue realizar un ejercicio práctico para detectar las debilidades del procedimiento establecido en el SVE que permita establecer una línea basal de las condiciones del suelo que determinan su diversidad biológica y funcionamiento como sistema agrícola.⁷

Estudios previos realizados: Se realizó una caracterización del suelo que arrojó que el suelo pertenece a la Categoría 2, tipo ferralítico, coarzítico, amarillo, rojizo lixiviado, medianamente saturado, poco profundo, humificado y erosionado, casi llano, de textura arcillosa, compacto, con 6 cm de profundidad efectiva (fertilidad), deficiente de magnesio y bajo contenido de materia orgánica.⁶

Procedimiento del muestreo

Se utilizó un muestreo de identificación para investigar acerca de las características del suelo y su biología a través de la obtención de muestras representativas. El área tenía forma circular y la zona de interés cubría 5 hectáreas equivalentes a la mitad del sitio. Se asumió como una única muestra ya que en el momento del muestreo no estaba cultivada y se empleó para el establecimiento de una línea base. A partir de los datos aportados en la Guía para el Muestreo de Suelos, Perú 2014 se muestrearon 23 puntos. Debido a la forma circular para facilitar la ubicación de los puntos de muestreos se trazó un rectángulo y sobre éste se hizo la distribución de los puntos como se muestra en la figura 1.⁷

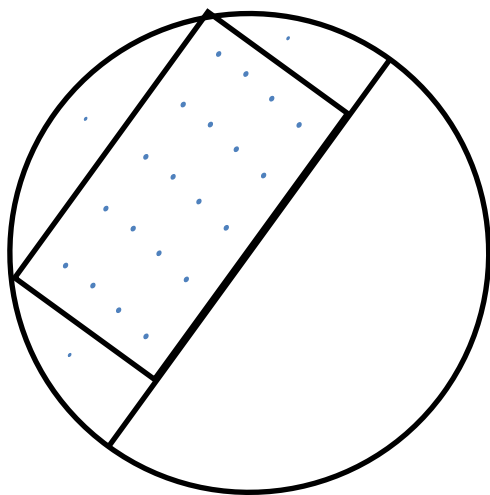


Figura 1. Esquema del área a muestrear y la distribución de los puntos para la toma de la muestra

Fauna asociada

En el lugar se analizó la fauna asociada al área. Se tomaron 23 puntos de muestreo, mediante el empleo de palas, cada punto con un área de 25x25x20 cm. Las muestras fueron ubicadas en bolsas limpias, se llenaron con aproximadamente 5kg de suelo, hasta un tercio de su capacidad para permitir un espacio y niveles de oxígeno que no afectaran la fauna del suelo, se cerraron herméticamente e identificaron mediante etiqueta con el código, fecha y hora de la toma de la muestra.^{7,8}

Las muestras obtenidas en los puntos fueron homogenizadas y se trasladaron al laboratorio de la Subdirección de Evaluaciones Toxicológicas y Medio Ambiente del Centro Nacional de Toxicología, solo la cantidad necesaria para realizar la cuantificación visual de la fauna del suelo y el montaje de los estudios, para determinar la respiración microbiana y evaluar los posibles efectos sobre invertebrados de suelo (lombriz de tierra).^{7,8}

Microfauna del suelo. Comunidad microbiana

El ensayo se desarrolló por la guía número 850.3200 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés). Se empleó el humus de lombriz que garantizó la carga microbiana. El sistema fue estático y en condiciones de oscuridad. La exposición ocurrió desde el inicio mediante el contacto e ingestión del sustrato constituido por muestras de suelo proveniente de áreas en las que se cultivó el OGM o humus de lombriz. La duración del estudio fue de 28 días, se evaluó la emisión de CO₂ de la comunidad microbiana (EPA, 2012a).⁹

Macrofauna suelo. Lombriz de tierra *Eisenia andrei*

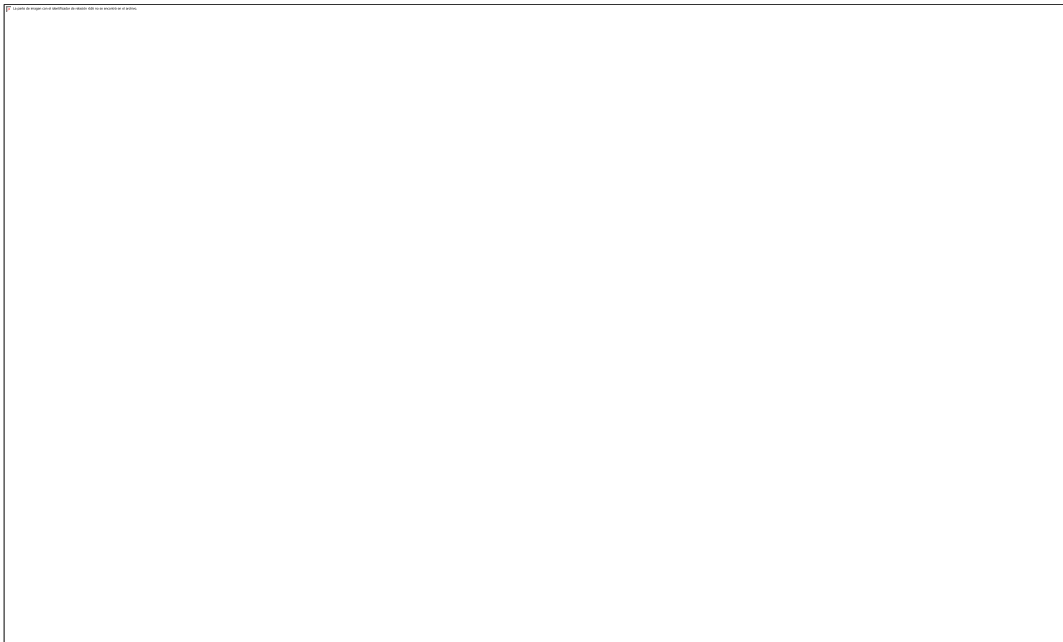
Se empleó el método descrito en las guías número 207 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, del inglés), la 850.3100 de la Oficina de Seguridad Química y Prevención de la Contaminación (OCSP, del inglés), así como la DIS 11268-1 de la Organización Internacional de Cooperación (ISO, del inglés), que establecen un sistema de ensayo estático. Se utilizaron lombrices de tierra mayores de 2 meses de edad con clitelo y peso entre 300 a 600 gramos mantenidas en condiciones de foto período de 14 h luz por 10 h oscuridad y temperatura en el rango entre 17 a 21 °C. Se utilizaron 30 lombrices por grupo a razón de 10 por réplica. La exposición ocurrió a través del contacto e ingestión del sustrato suelo agrícola, sustrato artificial y humus de lombriz. Se evaluó cada siete días la ocurrencia de mortalidad, la presencia de alteraciones fisiológicas y conductuales como movimientos rápidos, disminución del movimiento, aspecto filiforme, daños en la región clitelar, abultamientos y constricciones, consistencia blanduzca y pérdida de fluidos, el estudio duró 28 días.¹⁰⁻¹²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fauna asociada

La fauna y microflora edáfica se utilizan como bioindicadores de la calidad del suelo y para determinar el grado de recuperación o degradación del mismo.¹³ En el sitio de muestreo la fauna estaba representada por saltamontes, mosquitos, mariposas y grillos. Al analizar las muestras trasladadas al laboratorio se encontraron los organismos que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Fauna asociada al sitio de muestreo

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the content of Table 1. The box is currently blank.

La actividad de la fauna del suelo tiene un efecto profundo en las propiedades y procesos físicos y químicos que en el ocurren. Los efectos directos o indirectos de los organismos del suelo hacia el suelo se han estudiado, pero aún hace falta profundizar en muchos de ellos.¹⁰ Aspectos como la diversidad y multifuncionalidad de la fauna del suelo es importante para el funcionamiento del suelo, ya que influyen en los procesos de descomposición y mineralización de nutrientes. La fauna asociada al suelo tuvo una ligera diversidad y abundancia.^{14,15}

Como es conocido muchas toxinas Bt pueden persistir en el suelo o en los excrementos de diferentes herbívoros e invertebrados del suelo durante más de una temporada de crecimiento. Los efectos subletales pueden conducir a cambios de población a largo plazo. Los sistemas muestran respuestas retardadas directas o indirectas a las toxinas dependiendo de la generación y edad del organismo. Por esta razón, un plan de seguimiento a largo plazo debe implementarse que se extienda más allá del período de cultivo de OGM.¹¹

El monitoreo de los efectos adversos de CMG en el campo no solo tiene en cuenta los efectos monocausales sobre especies individuales como ocurre en los ensayos de laboratorio también debe determinar las consecuencias directas

e indirectas de la cadena trófica, el efecto sobre organismos, sus comunidades ecológicas y funciones. Las guías para el monitoreo de suelo en campo establecen tres niveles de estimación: efectos y exposición identificados en ensayos de laboratorio e investigaciones experimentales, servicio al ecosistema brindado por los organismos del suelo y la biodiversidad del suelo.¹²

Los macroinvertebrados producen efectos directos sobre las propiedades del suelo como lo son la humificación y mineralización de la materia orgánica. Sus actividades se realizan a una escala de centímetros a decímetros, y los denominados ingenieros del ecosistema (lombrices, termitas y hormigas) junto con las raíces, determinan la arquitectura del suelo a través de la acumulación de agregados y poros de diferentes tamaños lo que repercute en la estructura del suelo y en la fertilidad del mismo.¹⁵

Los OGM pueden afectar la biodiversidad y el funcionamiento del suelo por ello se deben monitorear los siguientes aspectos: grupos de animales que proporcionen información sobre descomposición, equilibrar, amortiguar y restaurar las propiedades del suelo, determinación de los efectos directos de los OGM, los organismos del suelo también se pueden usar para monitorear el paisaje cambios causados indirectamente por el cultivo de OGM, en particular debido a cambios en el suelo métodos de cultivo y rotación de cultivos.¹¹

Uno de los principales métodos para investigar el impacto de los cultivos modificados genéticamente sobre la seguridad ambiental es el monitoreo de la biodiversidad en el campo.²⁰ Algunos estudios revelan que la transgénico de maíz *cry1le* no tienen impacto sobre las comunidades de artrópodos en campo,²¹⁻²³ al mismo tiempo escasos estudios han sido reportado acerca del impacto sobre las comunidades de fauna del suelo.²⁴

Microfauna del suelo. Comunidad microbiana

Las comunidades microbianas son los componentes funcionales más importantes de la biota del suelo, ya que juegan un papel importante en el flujo de energía, transformación de nutrientes y reciclaje de elementos.²⁵ Al evaluar

la respiración microbiana se demostró que en la tierra proveniente de los suelos agrícolas la actividad microbiana fue nula como se observa en la figura 2, constatando la poca carga de materia orgánica de los mismos lo que se corrobora con la caracterización del suelo aportada en el sitio de muestreo.

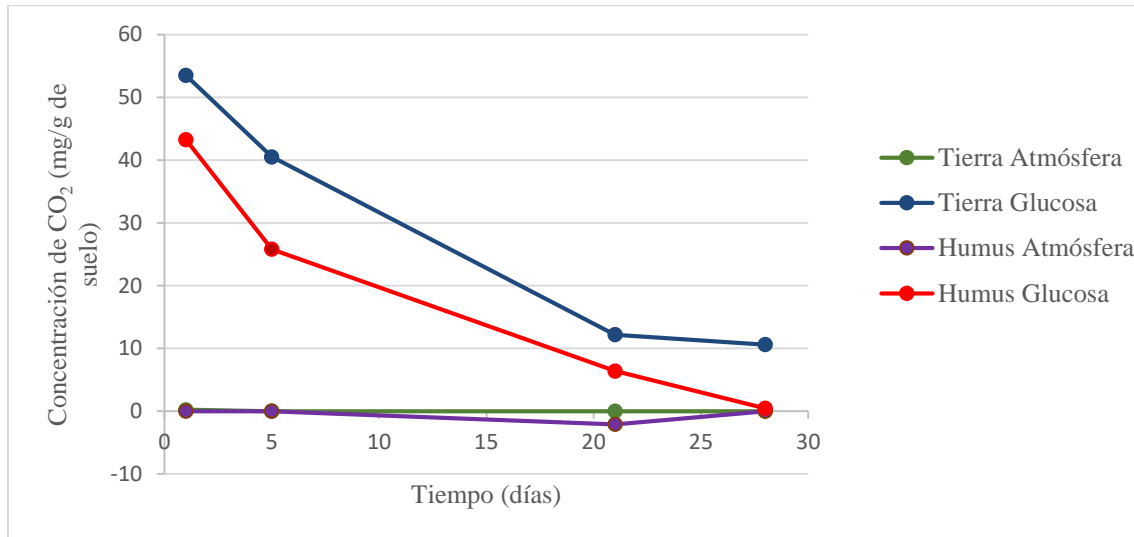


Figura 2. Comportamiento de la respiración microbiana durante el estudio

Debido a su complejidad, la mayoría de los servicios prestados por organismos individuales o grupos de organismos no se pueden cuantificar directamente como lo constituye la medición de la potencial actividad de todos los organismos del suelo para determinar el mantenimiento de los ciclos de nutrientes, para ello habría que evaluar de forma directa los servicios de los organismos del suelo claramente definibles; medir indirectamente dichos servicios determinando las características estructurales de las comunidades de organismos del suelo o medir las propiedades abióticas del suelo.²⁶

El conocimiento de los efectos sobre la microfauna del suelo es importante ya que aporta datos referentes a los cambios relacionados con los OGM en la estructura y función de la microflora del suelo, en particular en la rizósfera o capa de hojarasca, puede alterar las tasas de transformación de carbono y, como resultado, modificar los suministros de material orgánico a largo plazo. Además, los cambios de nutrientes pueden causar cambios en la red trófica del suelo y afectar a los taxones particularmente en los niveles tróficos inferiores (saprófagos, microbívoros).²⁷

Las diferencias encontradas en la diversidad y abundancia de la población bacteriana entre cultivos transgénicos y los cultivos convencionales, está influenciada por varios factores como la etapa de desarrollo de la planta, el año y el tipo de suelo.^{28,29} Así mismo se ha observado para comunidades de hongos y actinobacterias, estas últimas han mostrado un aumento en el maíz transgénicos en las etapas de maduración, mientras que los hongos no han tenido cambios significativos a nivel de filo, pero a nivel de género el hongo *Fusarium* ha disminuido su abundancia.³⁰ Las diferencias entre ambos grupos causadas por el genotipo de la planta no se han podido evidenciar en años consecutivos y los estudios de una sola temporada de cultivo pueden generar confusión, por lo que se recomienda hacer una la replicación anual.³¹

Los resultados obtenidos corroboraron una menor actividad de la fauna asociada al suelo relacionado con los bajos niveles de materia orgánica, se demostró la factibilidad de la aplicación para la toma de muestra de suelo del procedimiento elaborado dentro del SVE.

Macrofauna suelo. Lombriz de tierra *Eisenia andrei*

Los macroinvertebrados del suelo, organismos cuyo ancho es superior a 2 mm, conocidos como macrofauna, intervienen en distintos procesos en: agregación y estructura del suelo, la textura y consistencia del suelo, movimiento y retención del agua, el intercambio gaseoso, las propiedades químicas y nutricionales del mismo existiendo un fuerte efecto del tipo de vegetación sobre ellos.³² Los suelos de los sistemas naturales, como las selvas o bosques tropicales, cuentan con una entrada constante y frecuente de materia orgánica de origen vegetal y animal, por lo que los agroecosistemas deben parecerse cada vez más a los sistemas naturales.³³

El estudio duró 28 días, los valores del pH de los tres sustratos empleados se determinaron en el ensayo al inicio y final, como se aprecia en la Tabla 2, se encontraron dentro del rango de pH óptimo para esta especie.

Tabla 2. Fauna asociada al sitio de muestreo

pH	Suelo agrícola	Sustrato artificial	Humus
----	----------------	---------------------	-------

Inicio	8.33	7.73	8.34
final	8.16	8.09	8.16

Los valores de iones de hidrógeno registrados en todos los casos fueron inferiores a 8.5 valor considerado como límite superior por muchos autores para el desarrollo óptimo de esta especie. Los valores de pH del suelo tienen una influencia marcada en la presencia de lombrices, así como en los procesos de degradación que ocurran en este compartimento ambiental.^{34,35}

En las lombrices de ninguno de los grupos de tratamiento ocurrió mortalidad ni alteraciones fisiológicas y conductuales. Se midió el peso de los organismos en los días 7, 14, 21 y 28, resultados que se muestran en la figura 2.

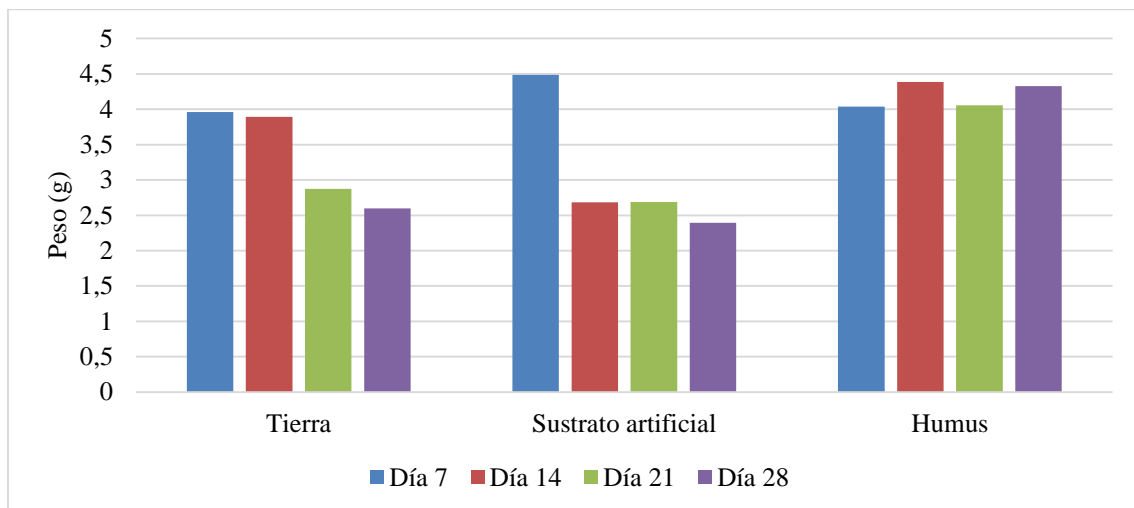


Figura 2. Comportamiento del peso de las lombrices durante el estudio

Al finalizar el estudio se constató que las lombrices del grupo expuesto al humus de lombriz, tuvieron mayor peso que las expuestas al resto de los sustratos.³⁰ Sin embargo, el comportamiento del peso fue similar entre las lombrices pertenecientes al suelo proveniente del área muestreada y las del sustrato artificial que recomiendan las guías para este tipo de ensayo, estos resultados avalan la inexistencia de efectos adversos sobre la lombriz de tierra. Măruțescu en el año 2012 demostró que no existen evidencias de acumulación en muestras de suelo en campos cultivados con plantas Bt en monocultivo durante tiempo prolongado, a pesar de la rápida unión de las proteínas Cry a sustratos de arcilla mineral y humus.³⁶

El monitoreo del compartimento suelo en los CMGes necesario ya que la red alimentaria del suelo puede afectarse por la transferencia de toxinas a través de varios niveles tróficos por ello es necesario la implementación del SVE que permita el monitoreo de los CMG que se auxilie en el Plan de Monitoreo Medio Ambiental como instrumento eficaz para alcanzar dichos fines.

El ejercicio demostró la factibilidad de la aplicación del procedimiento para la toma de muestra de suelo elaborado dentro del SVE y permitió la identificación de las brechas en su ejecución entre ella la necesidad de: constatar la veracidad de las características del área a muestrear, informar debidamente los tiempos de siembra y cosecha para la planificación efectiva de los muestreos, capacitar a los representantes territoriales de la ORSA en la aplicación de la encuesta que se recogerá cuando se proceda al muestreo post-cosecha, garantizar por parte de los inspectores ambientales el personal que coopere con la ejecución del muestreo asesorados por los compañeros de la ORSA.

CONCLUSIONES

El ejercicio práctico contribuyó a identificar brechas en la implementación del SVE, mediante las lecciones aprendidas.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto internacional GEF PNUMA “Creación de capacidades adicionales en bioseguridad para la implementación del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología en Cuba”, por lo recursos para el desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Observatorio Medioambiental. Kitiara Luque Polo. Seguridad alimentaria y alimentos transgénicos. Obs. Medioambient. 2017, 20: 59-75. <http://dx.doi.org/10.5209/OBMD.57946>.
2. Prabhu KV. Use of GMOs under containment confined and limited field trials and post-release monitoring of GMOs. In: Chowdhury MKA, Hoque

- MI, and Sonnino A (eds). Biosafety of genetically modified organisms: basic concepts, methods and issues. Roma: FAO; 2019. p. 157-220.
3. Graef F. Methodological scheme for designing the monitoring of genetically modified crops at the regional scale. Environmental Monitoring and Assessment. 2005 ; 111: 1–26
 4. Bartsch D. Concepts for General Surveillance of Genetically Modified (GM) Plants: The EFSA position. Journal of Consumer Protection and Food Safety. J Verbr Lebensm1 2006; Supplement 1: 15–20
 5. Padrón Padilla A, Extremera San Martín D. Transgénicos en Cuba: el encuentro entre necesidad, ciencia y tecnología. Cubadebate [Internet] 2020. Noviembre 10. [citado 10 marzo 2020]; 1: [aprox. 2 p.] Disponible en <http://www.cubadebate.cu/especiales/2020/11/10/transgenicos-en-cuba-el-encuentro-entre-necesidad-ciencia-tecnología/amp/>
 6. Cuba. Empresa Agropecuaria CUBAQUIVIR. Informe de las características del área a muestrear. CUBAQUIVIR. 2022.
 7. Guía para el Muestreo de Suelos / Ministerio del Ambiente. Ministerio del Ambiente. Dirección General de Calidad Ambiental. -- Lima Perú.: MINAM, 2014. <https://www.minam.gob.pe/calidadambiental/wp-content/uploads/sites/22/2013/10/GUIA-PARA-EL-MUESTREO-DE-SUELOS-final.pdf>
 8. Graef F. Methodological scheme for designing the monitoring of genetically modified crops at the regional scale. Environmental Monitoring and Assessment 2005; 111: 1–26
 9. Environmental Protection Agency. EPA Ecological Effects Test Guidelines: Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA: OCSP 850.3200. Washington: EPA; 2012.
 10. Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals. Test No. 207: Earthworm, acute toxicity test. Paris: OECD; 1984. doi: 10.1787/9789264070042-en
 11. Environmental Protection Agency. Ecological effects test guidelines. OCSP 850.3100: Earthworm subchronic toxicity test. [Internet]. Washington: EPA; 2012. [acceso 15 ene 2023]. Disponible en: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0154-0019>

12. International Organization for Standardization. Guideline DIS 11268-1: Soil quality—effects of pollutants on earthworms. Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*. [Internet]. Geneva: ISO; 2018. [acceso 9 may 2023]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/53527.html>
13. Pascual-Córdova G, Obrador-Olán JJ, Carrillo-Ávila E, García-López E, Sánchez-Soto S, Guerrero-Peña A, et al. Indicadores de calidad del suelo en el agroecosistema caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Revista Facultad de Agronomía. 2018; 35: 1-25
14. Hole FD. Effects of animals on soil. *Geoderma*. 1981; 25: 75-112.
15. Sirinathsinghi E. Los cultivos Bt han superado su fecha de caducidad: ¿una tecnología defectuosa en busca de nuevos mercados?. Third World Network Bhd (198701004592 (163262-P)). 131 Jalan Macalister. 10400 Penang. Malasia; 2022.
16. Züghart W, Beismann H, Schröder W. Tools for a scientifically rigorous and efficient monitoring of genetically modified organisms (GMOs) – VDI Guidelines to ensure high quality of GMO-monitoring data. *BioRisk* [Internet]. 2013; [acceso 9 may 2023]. 8: [aprox. 10 p.]. doi: 10.3897/biorisk.8.4036 www.pensoftonline.net/biorisk
17. Lang-Ovalle PF, Pérez-Vázquez A, Martínez-Dávila JP, Platas-Rosado DE, Ojeda-Enciso LA, González-Acuña IJ. Macrofauna edáfica asociada a plantaciones de mango y caña de azúcar. *Terra Latinoamerica*. 2011; 29:169-77.
18. Franco ALC, Bartz MLC, Cherubin MR, Baretta D, Cerri CEP, Feigl BJ, et al. Loss of soil (macro) fauna due to the expansion of Brazilian sugarcane acreage. *Science of the Total Environment*. 2016; 563-4.
19. Lavelle P, Decaens T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, et al. Soil invertebrates and ecosystem services. *Eur. Soil Biol*. 2006; 42: 3-15.
20. Song XY. Strategy of environmental bio-safety assessment for transgenic plants. *Journal of Biosafety*. 2011; 20, 37–42.
21. Zuo J. Progress on safety evaluation of transgenic corn. *Maize Science*. 2014; 22: 73–8.

22. Guo J. Field trials to evaluate the effects of transgenic *cry1le* maize on the community characteristics of arthropod natural enemies. *Scientific Reports*. 2016; 6: 10.
23. Guo J. Effects of transgenic *cry1le*, maize on non-lepidopteran pest abundance, diversity and community composition. *Transgenic Research*. 2016; 25: 1–12.
24. Zhang, G., Wan, F., Lövei, G. L., Liu, W. & Guo, J. Transmission of Bt toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera:Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic Bt cotton. *Environmental Entomology* 35, 143–150 (2006).
25. Chunmiao Fan, Fengci Wu, Jinye Dong, Baifeng Wang, Junqi Yin & Xinyuan Song. No impact of transgenic *cry1le* maize on the diversity, abundance and composition of soil fauna in a 2-year field trial. Published online: 17 July 2019
26. Souza RA, Telles TS, Machado W, Hungria M, Filho JT, Guimarães MF (2012) Effects of sugarcane harvesting with burning on the chemical and microbiological properties of the soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 155: 1-6
27. Stechauner RR, Madriñán MR (2013) Interacción macrofauna-microbiota: Efectos de la transformación de residuos de cosecha sobre la actividad de β -glucosidasa edáfica. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11: 184-195
28. Carrero-Ramírez AS, Carrillo-Menjura LJ, Sánchez-Leal LC. Impacto del maíz transgénico sobre las comunidades microbianas del suelo y plantas: una revisión sistemática. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*. 2022; 34(1): 192-201.
29. Bai X, Zeng X, Huang S, Liang J, Dong L, Wei Y, et. al. Marginal impact of cropping BADH transgenic maize BZ-136 on chemical property, enzyme activity, and bacterial community diversity of rhizosphere soil. *Plant and Soil*. 2019; 436(1–2): 527–41.
30. Zhou X, Liang J, Luan Y, Song X, Zhang Z. The influence of genetically modified glyphosate-tolerant maize CC-2 on rhizosphere bacterial communities revealed by miseq sequencing. *Plant, Soil and Environment*. 2020; 66(8): 387–94.

31. Cotta SR, Dias AC, Marriel F, Gomes IE, Van Elsas JD, Seldin L. Temporal dynamics of microbial communities in the rhizosphere of two genetically modified (GM) maize hybrids in tropical agrosystems. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2013; 103(3):589–601.
32. Szoboszlay M, Näther A, Mullins E, Tebbe CC. Annual replication is essential in evaluating the response of the soil microbiome to the genetic modification of maize in different biogeographical regions. *PLoS ONE*. 2019;14(12): e0222737.
33. Lavelle P, Spain A. *Soil ecology*. Amsterdam: Kluwer; 2001.
34. Huerta E, Lwanga Rodríguez J, Montejo E, Cruz-M de la, García R. Relación entre la fertilidad del suelo y su población de macroinvertebrados. *Terra Latinoam*. 2008; 26 (2):171-81.
35. Neher DA, Olson RK. Nematode communities in soils of four farm cropping management systems. *Pedobiologie* 1999; 43(5):430-8.
36. Blouina M, Hodsonb ME, Delgado EA, Baker G, Brussaard L, Butt KR, et al. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*. 2013; 64:161–82.
37. Măruțescu A. A brief survey regarding fate of Bt proteins synthesized by transgenic maize in soil. *Journal of Horticulture*. 2012; 16(2): 126-30.