

## TOXICIDAD *in vitro* DE LOS HERBICIDAS ATRAZINA Y PARAQUAT SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACIÓN DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Wilberth CHAN CUPUL<sup>1\*</sup>, Gabriela HEREDIA ABARCA<sup>1</sup>, Refugio RODRÍGUEZ VÁZQUEZ<sup>2</sup> y Rosa María ARIAS MOTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Micromicetos, Red de Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología A. C. Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, C.P. 91070, Xalapa, Veracruz, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Xenobióticos, Depto. Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, A. P. 14-740, Col. Zacatenco, C.P. 07360, México D.F.

\*Autor de correspondencia: wilberth\_20@hotmail.com

(Recibido julio 2013, aceptado: agosto 2014)

Palabras clave: agroquímicos, dosis-respuesta, hongo-suelo, micobiota

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad *in vitro* de los herbicidas atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios del suelo. Se realizaron bioensayos dosis-respuesta en trece especies con cuatro concentraciones de atrazina (468, 937, 1875 y 3750 mg/L) y paraquat (93, 187, 375 y 750 mg/L). Los hongos fueron inoculados con 2  $\mu$ L de una suspensión de  $1.0 \times 10^6$  esporas/mL en cajas de Petri con agar papa dextrosa (APD) adicionado con atrazina y paraquat. Se cuantificó la tasa de crecimiento diaria (TCD), el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (% ICM), la esporulación y la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>). *Paecilomyces carneus* (0.26 cm<sup>2</sup>/día) aumentó significativamente su TCD y mantuvo su esporulación ( $3.7 \times 10^5$  esporas/mL) a la concentración de 468 mg/L de atrazina. Los % ICM de *Paecilomyces carneus*, *P. marquandii* y *P. lilacinus* a 3750 mg/L de atrazina fueron de 22.6 %, 44.4 % y 46.3 %; con una CE<sub>50</sub> de 6820 mg/L, 4736 mg/L y 3633 mg/L, respectivamente. El paraquat presentó mayor toxicidad que la atrazina; *P. carneus* (0.27 cm<sup>2</sup>/día) mantuvo significativamente su TCD a las concentraciones de 93 y 187 mg/L de paraquat. *Aspergillus tamaris* obtuvo la CE<sub>50</sub> más alta (256.4 mg/L) de paraquat. El género *Paecilomyces* spp. y *A. tamaris* resultaron tolerantes a la atrazina y paraquat, respectivamente. Estas cepas son candidatas para establecer estudios sobre la micorremediación de ambos herbicidas en biotecnología ambiental.

Key words: agrochemicals, dose-response, soil-fungus, mycobiota

### ABSTRACT

The objective of this study was to assess the *in vitro* toxicity of the herbicides atrazine and paraquat on vegetative growth and sporulation of saprobic soil fungi. In thirteen strains of fungi isolated from soil, doses-response bioassays were performed with four concentrations of herbicides: atrazine (468, 937, 1875 and 3750 mg/L) and paraquat (93, 187, 375 and 750 mg/L). The fungi were inoculated with 2  $\mu$ L of a spore suspension

( $1 \times 10^6$  spores/mL) in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) supplemented with herbicides. Daily growth rates (DGR), percent inhibition of mycelial growth (% IMG), sporulation and the median effective concentration ( $EC_{50}$ ) were evaluated. *Paecilomyces carneus* significantly showed the highest DGR ( $0.26 \text{ cm}^2/\text{day}$ ) and maintained its sporulation rate ( $3.7 \times 10^5$  spores/mL) at 468 and 937 mg/L of atrazine. The % IMG of *P. carneus*, *P. marquandii* and *P. lilacinus* at 3750 mg/L of atrazine in APD were: 22.6 %, 44.4 % and 46.3 %; with an  $EC_{50}$  of 6820 mg/L, 4736 mg/L and 3633 mg/L, respectively. Paraquat was more fungitoxic than atrazine; *P. carneus* significantly maintained its DGR ( $0.17 \text{ cm}^2/\text{day}$ ) under 93 and 187 mg/L of paraquat. The  $EC_{50}$  of paraquat showed the lowest values compared to atrazine; *Aspergillus tamaritii* obtained the highest  $EC_{50}$  (256.4 mg/L) in paraquat. The genus *Paecilomyces* spp. and *A. tamaritii* were the most tolerant to atrazine and paraquat, respectively. These strains are candidates to be included in studies regarding the biodegradation of both herbicides in environmental biotechnology.

## INTRODUCCIÓN

Con el propósito de obtener altos rendimientos la agricultura moderna demanda el uso de una amplia variedad de compuestos agroquímicos (González *et al.* 2010). En México más del 45 % de los plaguicidas comercializados son herbicidas, de los cuales los más empleados son la atrazina y el paraquat (Hernández y Martínez 2006, González y Hansen 2009). Desde 1975 la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1, 3, 5-triazina) ha sido ampliamente utilizada para el control selectivo de malezas en cultivos de importancia económica como la caña de azúcar y el maíz (Raymundo *et al.* 2009). Es un herbicida sistémico preemergente, el cual, a pesar de ser considerado de persistencia media (< 12 meses), por su movilidad en el suelo y sus propiedades físicas y químicas lo convierten en un contaminante de aguas subterráneas, lo que representa un riesgo al ambiente y a la salud (Cejudo *et al.* 2008). En estudios toxicológicos se ha relacionado positivamente la exposición a la atrazina con la aparición de hermafroditismo y daños al sistema endocrino e inmune en anfibios (Hayes *et al.* 2002, Brodtkin *et al.* 2007). En humanos su efecto carcinogénico aún está en discusión (Adami *et al.* 2011, Simpkins *et al.* 2011).

Por su parte, el paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida de contacto no selectivo, fue introducido a México en 1969 y hasta hoy en día, a pesar de su alta toxicidad, es uno de los compuestos más usados para el control de malezas de hoja ancha y pastos (Hernández y Martínez 2006). En los últimos años, se han publicado investigaciones que sugieren que este herbicida podría estar relacionado con padecimientos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Dinis *et al.* 2006, Berry *et al.* 2010).

En las áreas agrícolas el uso excesivo de herbicidas afecta la calidad del suelo, por lo que su aplicación ha sido cuestionada en el manejo sustentable de los agroecosistemas (Soto *et al.* 2009). La persistencia y acumulación de estas sustancias en la matriz edáfica ejerce efectos negativos sobre los organismos no blanco, como los hongos y las bacterias (Saeki y Toyota 2004), entre los que hay especies muy sensibles a cambios ambientales cuando los suelos son sometidos a diferentes tipos de manejo (Frey *et al.* 1999, Sebiomo *et al.* 2011). La conservación de la microbiota edáfica es fundamental para mantener la fertilidad y la productividad de los suelos dada su participación en el reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de los restos vegetales. Asimismo diversas especies fúngicas ocasionan la supresión de importantes fitopatógenos y producen tanto fitohormonas como enzimas capaces de degradar compuestos tóxicos (Sahid *et al.* 1981, Gleason *et al.* 2010).

Diversos estudios señalan que los herbicidas interfieren con el crecimiento, la respiración, la esporulación y la germinación de las esporas de los hongos del suelo (Rodríguez *et al.* 1967, Mekwatanakarn y Sivasithamparam 1987, El-Ghany y Tayel 2009). El grado de susceptibilidad de los hongos a los herbicidas está relacionado con su capacidad para degradar y mantener concentraciones bajas del contaminante en el micelio (Poprawski y Majchrowicz 1995, Rachappa *et al.* 2007).

Adicionalmente la evaluación de aislamientos fúngicos nativos para tolerar y degradar a los herbicidas es primordial en la selección de cepas para futuras investigaciones encaminadas a la remediación de suelos contaminados con estos agentes químicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la toxicidad de los herbicidas atrazina y paraquat en el crecimiento vegetativo y en la esporulación de trece

cepas de hongos saprobios de suelos de fincas de una de las zonas cafetaleras más importantes de México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivación de los aislamientos

Los aislamientos fúngicos se obtuvieron del cepario del laboratorio de micromicetos del Instituto de Ecología A. C., en Xalapa, Veracruz, México. Los hongos fueron aislados e identificados por Heredia y Arias (2008) de muestras de suelos de fincas de café (*Coffea arabica* L.) ubicadas en la región central del estado de Veracruz. Las cepas fueron reactivadas en agar papa dextrosa (APD; Bioxon<sup>®</sup>, México) e incubadas a 25 °C, 75 ± 3 % de humedad relativa en oscuridad total.

### Herbicidas empleados

Las siguientes formulaciones comerciales fueron empleadas. Para la atrazina se usó el Desyerbal 500<sup>®</sup> (Anajalsa S. A. de C. V., México) a una concentración de 500 g/L de ingrediente activo (I. A.) a 25 °C. De acuerdo con la recomendación del producto, la dosis aplicada en campo es de 3750 mg de I. A./L de agua (1.5 L de producto comercial en 200 L de agua). Para el paraquat, se empleó la formulación comercial de Paraquat 250 SL<sup>®</sup> (Agro-grow<sup>®</sup>, México) a una concentración de 250 g/L de I. A. Por recomendación del producto la dosis aplicada en campo es de 1500 mg de I. A./L de agua (1.25 L de producto en 200 L de agua).

### Preparación del medio de cultivo con diferentes dosis de herbicidas

La adición de las diferentes concentraciones de herbicidas al APD se efectuó un vez que el medio previamente esterilizado llegó a los 40 ± 5 °C. Posteriormente el medio se agitó manualmente y se vació en cajas de Petri de 90 × 15 mm de Ø a razón de 20 mL/por caja. Para el grupo testigo se emplearon placas con APD sin herbicidas.

### Preparación del inóculo para los bioensayos

A partir de cultivos de siete días de crecimiento se extrajeron del centro de las colonias discos mediante sacabocados (5 mm de Ø) y se depositaron en tubos Eppendorf (1.5 mL) con 1 mL de agua destilada esterilizada y Tween 80 (Sigma<sup>®</sup>, México) al 0.05 %. Los tubos se agitaron durante un minuto con un vórtex, posteriormente la concentración de esporas de la solución se determinó empleando una cámara de Neubauer doble rayado línea regular (Marienfeld<sup>®</sup>,

Alemania) y un microscopio de campo claro Nikon<sup>®</sup> Mod. Eclipse E600 (Nikon<sup>®</sup>, Japón). La solución de esporas se ajustó a una concentración de  $1.0 \times 10^6$  esporas/mL según el método de Gindin *et al.* (2000).

### Bioensayo dosis repuesta

Las dosis evaluadas para la atrazina fueron: 0.125 X (468 mg/L), 0.25 X (937 mg/L), 0.5 X (1875 mg/L) y 1 X (3750 mg/L). En el caso del paraquat, por su alta toxicidad y por inhibir el 100 % del crecimiento de los aislamientos a dosis de campo (datos no mostrados), las concentraciones evaluadas fueron: 0.062 X (93 mg/L), 0.125 X (187 mg/L), 0.25 X (375 mg/L) y 0.5 X (750 mg/L). Los aislamientos se inocularon con 2 µL de una solución de  $1.0 \times 10^6$  esporas/mL en el centro de las placas con APD, más las diferentes concentraciones de herbicida probadas. Los hongos *Chaetomium fusiforme* y *Humicola fuscoatra*, presentan una escasa esporulación, por lo que, a excepción de los anteriores fueron inoculados con un disco de micelio-agar de 5 mm de Ø.

Las cajas Petri se incubaron a 25 °C en oscuridad total. Se emplearon cuatro réplicas independientes por cada concentración de herbicida. Cada 24 h al reverso de las placas, se les tomó una fotografía a las colonias con una cámara digital Kodak<sup>®</sup> a una distancia de 20 cm entre la caja Petri y la cámara. A partir de las imágenes digitales se calculó el área de crecimiento del micelio por medio del programa ImageJ<sup>®</sup> 1.44 (Rasband 2011) con base en la escala de  $1 \text{ cm}^2 = 358.6$  pixeles.

### Variables evaluadas

Se evaluó la tasa de crecimiento diaria (TCD), el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (% ICM) por efecto del herbicida con respecto al tratamiento testigo, la esporulación y la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) del herbicida (definida como mg/L de herbicida que inhibe el 50 % del crecimiento micelial). La TCD se determinó al calcular el área de la colonia cada 24 h, hasta el día en que el micelio de los tratamientos testigo cubrió toda la superficie de la caja Petri. La TCD fue calculada con la fórmula  $TCD = X \sum (C_{t1} - C_{t1-1} \dots n)$ , donde, n = es el número de evaluaciones y  $C_t$  = es el número de días de crecimiento (Poprawski y Majchrowicz 1995). El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la ecuación:  $\% ICM = [(C-T) / C] \times 100$ , donde C es el área del micelio en la caja Petri del tratamiento testigo (sin herbicida) y T es el área del micelio en la caja del tratamiento con herbicida (Zamora *et al.* 2008).

La esporulación (esporas/mL) se evaluó con la metodología descrita en la preparación del inóculo (Gindin *et al.* 2000). La  $CE_{50}$  para cada especie se calculó con los porcentajes de inhibición en cada concentración de herbicida evaluada a través de un análisis Probit del programa estadístico SAS ver. 8 para Windows (SAS 2000). Para el análisis estadístico de los resultados de la TCD, el porcentaje de inhibición y la abundancia de esporas, se aplicó un análisis de varianza y la comparación de medias Tukey ( $P = 0.05$ ) por medio del programa GraphPad InStat para Windows (GraphPad 2000).

## RESULTADOS

### Efecto de diferentes concentraciones de atrazina sobre los hongos saprobios estudiados

*Tasa de crecimiento diaria y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.* En todas las cepas la inhibición en el crecimiento de las colonias se incrementó a medida que aumentó la concentración del herbicida en el APD, sin embargo en ningún caso llegó al 100 %. En los tratamientos con la mayor concentración de atrazina (3750 mg/L), los porcentajes de inhibición más bajos se detectaron en *Paecilomyces carneus*, *P. marquandii* y *P. lilacinus* (% ICM = 22.6 %, 43.4 % y 46.3 %, respectivamente). Entre estos, las especies *P. lilacinus* ( $F = 73.95$ ,  $P < 0.05$ ) y *P. carneus* ( $F = 18.03$ ,  $P < 0.05$ ) sobresalieron por no presentar inhibición en la concentración más baja (468 mg/L) del herbicida. Los aislamientos más susceptibles fueron *Trichoderma spirale* y *T. aggressivum* con porcentajes de inhibición del 88.8 y 86.5 % en la concentración más baja y de 96.9 y 96 % en la más alta, respectivamente (**Cuadro I**).

*Abundancia de esporas.* En ninguna de las cepas estudiadas la producción de esporas fue inhibida totalmente por las concentraciones de atrazina aplicadas. Con excepción de algunos casos, en la mayoría de las especies el número de esporas disminuyó a medida que aumentó la concentración de la atrazina. *Paecilomyces carneus* y *T. aggressivum* fueron las especies en las que la abundancia de esporas fue más afectada por la mayor concentración de atrazina. En las cepas de *Penicillium glabrum* y *T. spirale* (**Cuadro I**) los valores de abundancia de esporas en los tratamientos con la menor dosis de atrazina fueron significativamente mayores a los tratamientos testigo ( $F = 6.08$ ,  $P < 0.05$  y  $F = 63.85$ ,  $P < 0.05$ , respectivamente).

*Concentración efectiva media.* De acuerdo con el traslape de los intervalos de confianza, las concentra-

ciones efectivas medias más bajas de atrazina fueron detectadas para los hongos *Trichoderma spirale* y *T. aggressivum* (8.4 y 16.9 mg/L, respectivamente; **Cuadro II**) y las más altas para *Paecilomyces lilacinus* (3633.0 mg/L), *P. marquandii* (4736.0 mg/L) y *P. carneus* (6820.0 mg/L), lo que indica que estos tres aislamientos tienen capacidad para tolerar la atrazina incluso a concentraciones mayores a las que se aplican en el campo.

### Efecto de diferentes concentraciones de paraquat sobre los hongos saprobios estudiados

*Tasa de crecimiento diaria y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial.* En todas las especies la inhibición del crecimiento fue marcadamente mayor que la detectada para la atrazina. Aún en las concentraciones más bajas fue notoria la inhibición del crecimiento para la mayoría de las especies. A partir del tratamiento con 187 mg/L hubo especies que no crecieron. En la dosis más alta nueve de las 13 especies tuvieron 100 % de inhibición. Asimismo, para la atrazina las cepas más afectadas correspondieron a las del género *Trichoderma*, que fueron inhibidas casi totalmente a partir de la concentración de 187 mg/L (**Cuadro III**).

Los aislamientos *Penicillium melinii*, *Aspergillus candidus*, *P. lilacinus* y *P. marquandii* fueron los únicos que se desarrollaron en la concentración más alta de paraquat (750 mg/L). Sin embargo, su crecimiento fue mínimo e inferior al testigo ( $P < 0.05$ ). *Paecilomyces carneus* destacó por ser la única especie que no fue inhibida a la concentración más baja, incluso tuvo una TCD en las concentraciones 93 y 187 mg/L significativamente mayor ( $F = 50.5$ ,  $P < 0.05$ ) al testigo. Aunque en los tratamientos con 375 y 750 mg/L de paraquat no creció. Entre las cinco especies que se desarrollaron en la concentración más alta, *P. melinii* y *P. marquandii* presentaron los porcentajes de inhibición menores (77.4 % y 88.4 %, respectivamente).

*Abundancia de esporas.* De las 11 especies con esporas evaluadas, en ocho la producción de esporas fue inhibida totalmente en los tratamientos con mayor concentración de paraquat. Con excepción de *P. melinii*, *P. glabrum* y *T. spirale* en el resto de las especies la abundancia de esporas en los diferentes tratamientos fue marcadamente menor a la de los testigos y disminuyó conforme aumentó la concentración del herbicida. En *A. candidus* ( $F = 82.37$ ,  $P < 0.05$ ), *P. glabrum* ( $F = 14.47$ ,  $P < 0.05$ ), *P. melinii* ( $F = 22.50$ ,  $P < 0.05$ ) y *T. spirale* ( $F = 18.71$ ,  $P < 0.05$ ) en la menor concentración del herbicida (93 mg/L) se encontró una mayor esporulación. La producción

**CUADRO I.** EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ATRAZINA SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACIÓN EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Especie	Atrazina (mg/L)	TCD (cm <sup>2</sup> /día)	ICM (%)	Esporulación (Esporas/mL)
1. <i>Aspergillus candidus</i>	Testigo	0.47 a	-	1.8 × 10 <sup>5</sup> a
	468	0.45 a	1.84 a	1.2 × 10 <sup>5</sup> b
	937	0.36 a	18.13 b	6.2 × 10 <sup>4</sup> c
	1875	0.23 b	43.69 c	6.8 × 10 <sup>4</sup> c
	3750	0.19 b	57.90 d	4.6 × 10 <sup>4</sup> c
2. <i>Aspergillus clavatus</i>	Testigo	0.89 a	-	8.3 × 10 <sup>5</sup> a
	468	0.42 b	56.61 a	6.2 × 10 <sup>5</sup> b
	937	0.33 bc	66.72 b	4.5 × 10 <sup>5</sup> bc
	1875	0.34 bc	72.58 b	3.8 × 10 <sup>5</sup> c
	3750	0.18 c	84.80 c	3.6 × 10 <sup>5</sup> c
3. <i>Aspergillus tamarii</i>	Testigo	2.52 a	-	1.4 × 10 <sup>6</sup> a
	468	1.59 b	29.98 a	1.3 × 10 <sup>6</sup> b
	937	1.21 c	45.24 b	1.0 × 10 <sup>6</sup> c
	1875	0.85 c	59.99 c	1.0 × 10 <sup>6</sup> c
	3750	1.22 d	58.69 c	8.0 × 10 <sup>5</sup> d
4. <i>Chaetomium fusiforme</i>	Testigo	1.60 a	-	NP
	468	1.50 a	5.72 a	NP
	937	1.23 b	18.39 b	NP
	1875	0.99 c	41.15 c	NP
	3750	0.58 c	61.76 d	NP
5. <i>Humicola fuscoatra</i>	Testigo	4.00 a	-	NP
	468	0.16 b	63.38 a	NP
	937	0.06 bc	81.83 b	NP
	1875	0.04 c	86.98 c	NP
	3750	0.01 c	92.10 d	NP
6. <i>Paecilomyces carneus</i>	Testigo	0.19 bc	-	3.5 × 10 <sup>5</sup> a
	468	0.26 a	0	4.0 × 10 <sup>5</sup> a
	937	0.22 ab	0	2.0 × 10 <sup>4</sup> b
	1875	0.16 bc	5.42 a	5.8 × 10 <sup>4</sup> b
	3750	0.14 c	22.62 b	2.3 × 10 <sup>4</sup> b
7. <i>Paecilomyces lilacinus</i>	Testigo	1.79 ab	-	1.3 × 10 <sup>6</sup> a
	468	1.88 a	0	1.2 × 10 <sup>6</sup> bc
	937	1.50 b	5.01 a	8.3 × 10 <sup>5</sup> cd
	1875	0.89 c	30.48 b	5.8 × 10 <sup>5</sup> de
	3750	0.75 c	46.37 c	3.3 × 10 <sup>5</sup> e
8. <i>Paecilomyces marquandii</i>	Testigo	1.41 a	-	2.5 × 10 <sup>6</sup> a
	468	0.85 cd	21.14 a	1.2 × 10 <sup>6</sup> b
	937	1.10 bc	22.98 a	8.7 × 10 <sup>5</sup> bc
	1875	0.55 d	44.17 b	5.6 × 10 <sup>5</sup> c
	3750	0.66 d	43.47 b	5.7 × 10 <sup>5</sup> c
9. <i>Penicillium glabrum</i>	Testigo	2.34 a	-	7.6 × 10 <sup>5</sup> b
	468	1.77 b	26.08 a	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	937	1.15 c	44.86 b	1.1 × 10 <sup>6</sup> b
	1875	0.72 d	57.48 c	9.1 × 10 <sup>5</sup> b
	3750	0.35 d	80.01 d	1.0 × 10 <sup>5</sup> b

**CUADRO I.** EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ATRAZINA SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACIÓN EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Especie	Atrazina (mg/L)	TCD (cm <sup>2</sup> /día)	ICM (%)	Esporulación (Esporas/mL)
10. <i>Penicillium implicatum</i>	Testigo	1.50 a	-	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	468	0.56 b	47.33 a	1.8 × 10 <sup>6</sup> a
	937	0.39 bc	54.68 ab	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	1875	0.34 bc	60.80 b	1.0 × 10 <sup>6</sup> b
	3750	0.18 c	74.79 c	5.1 × 10 <sup>5</sup> c
11. <i>Penicillium melinii</i>	Testigo	1.73 a	-	1.6 × 10 <sup>6</sup> a
	468	1.67 a	15.65 a	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	937	1.20 b	36.96 b	6.6 × 10 <sup>5</sup> b
	1875	0.73 c	63.83 c	8.7 × 10 <sup>5</sup> b
	3750	0.35 d	77.18 d	6.5 × 10 <sup>5</sup> b
12. <i>Trichoderma aggressivum</i>	Testigo	11.56 a	-	3.2 × 10 <sup>6</sup> a
	468	0.55 b	86.52 a	2.2 × 10 <sup>6</sup> b
	937	0.59 b	93.28 b	2.0 × 10 <sup>6</sup> b
	1875	0.43 b	96.37 c	1.5 × 10 <sup>5</sup> c
	3750	0.37 b	96.00 c	6.7 × 10 <sup>4</sup> c
13. <i>Trichoderma spirale</i>	Testigo	14.23 a	-	1.7 × 10 <sup>5</sup> b
	468	0.89 b	88.85 a	2.2 × 10 <sup>5</sup> a
	937	0.56 bc	94.90 b	1.0 × 10 <sup>5</sup> c
	1875	0.39 bc	95.61 b	5.2 × 10 <sup>4</sup> d
	3750	0.23 c	96.98 c	4.3 × 10 <sup>4</sup> d

Medias (n = 4) con literales diferentes entre filas por cada especie, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las especies *Chaetomium fusiforme* y *Humicola fuscoatra* no produjeron esporas en el medio de cultivo empleado (NP). TCD = tasa de crecimiento diaria en cm/día. ICM (%) = inhibición del crecimiento micelial.

**CUADRO II.** CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA (CE<sub>50</sub>) DE LA ATRAZINA EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Aislamiento	CE <sub>50</sub> (mg/L)	IC al 95% (mg/L)	Pendiente (M ± EE)	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr>χ <sup>2</sup>
<i>Aspergillus candidus</i>	2644.0 e	2434-2901	2.2 ± 0.1	Y = -7.6 + 2.2X	327.1	< 0.0001
<i>Aspergillus clavatus</i>	319.8 b	209.2-425.8	0.8 ± 0.1	Y = -2.2 + 0.8X	77.7	< 0.0001
<i>Aspergillus tamaritii</i>	1478.0 d	1250-1765	0.8 ± 0.09	Y = -2.7 + 0.8X	81.1	< 0.0001
<i>Chaetomium fusiforme</i>	2568.0 e	2353-2834	2.0 ± 0.1	Y = -7.0 + 2.0X	315.4	< 0.0001
<i>Humicola fuscoatra</i>	209.7 b	137.9-281.4	1.1 ± 0.1	Y = -2.7 + 1.1X	104.5	< 0.0001
<i>Paecilomyces carneus</i>	6820.0 f	5417-7772	3.2 ± 0.3	Y = -12.3 + 3.2X	94.1	< 0.0001
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	3633.0 f	3324-4033	2.6 ± 0.1	Y = -9.2 + 2.6X	271	< 0.0001
<i>Paecilomyces marquandii</i>	4736.0 f	3579-7201	0.8 ± 0.09	Y = -3.0 + 0.8X	70.1	< 0.0001
<i>Penicillium glabrum</i>	1211.0 d	1099-1332	1.5 ± 0.1	Y = -4.8 + 1.5X	238.9	< 0.0001
<i>Penicillium implicatum</i>	637.7 bc	469.2-794.1	0.7 ± 0.09	Y = -2.1 + 0.7X	64.8	< 0.0001
<i>Penicillium melinii</i>	1409.0 d	1304-1524	1.9 ± 0.1	Y = -6.2 + 1.9X	345.2	< 0.0001
<i>Trichoderma aggressivum</i>	16.9 a	1.6-51.8	0.8 ± 0.1	Y = -0.9 + 0.8 X	29.2	< 0.0001
<i>Trichoderma spirale</i>	8.4 a	0.2-35.9	0.7 ± 0.1	Y = -0.6 + 0.7X	21.8	< 0.0001

Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con el traslape de los intervalos de confianza. IC = intervalo de confianza al 95 %. M = media, EE = error estándar.

de esporas en las especies *A. clavatus*, *A. tamaritii*, *P. lilacinus*, *P. marquandii* y *P. implicatum* fue altamente afectada desde las dosis más bajas empleadas (**Cuadro III**).

*Concentración efectiva media.* De igual forma que para la atrazina, la concentración efectiva media más baja para el herbicida paraquat se detectó en la cepa de *T. spirale* (31.5 mg/L) (**Cuadro IV**), mientras

**CUADRO III.** EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PARAQUAT SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACIÓN EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Especie	Paraquat (mg/L)	TCD (cm <sup>2</sup> /día)	ICM (%)	Esporulación (Esporas/mL)
1. <i>Aspergillus candidus</i>	Testigo	0.63 a		1.8 × 10 <sup>5</sup> b
	93	0.42 b	26.95 a	7.3 × 10 <sup>5</sup> a
	187	0.27 c	51.16 b	5.3 × 10 <sup>4</sup> c
	375	0.14 d	73.27 c	3.1 × 10 <sup>4</sup> c
	750	0.07 d	91.59 c	2.4 × 10 <sup>4</sup> c
2. <i>Aspergillus clavatus</i>	Testigo	1.06 a	-	8.3 × 10 <sup>5</sup> a
	93	0.35 b	73.91 a	5.0 × 10 <sup>5</sup> b
	187	0.36 b	73.12 a	3.6 × 10 <sup>4</sup> c
	375	0.12 c	92.61 b	1.7 × 10 <sup>4</sup> c
	750	NC	100	-
3. <i>Aspergillus tamarii</i>	Testigo	2.22 a	-	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	93	1.78 b	19.25 a	5.6 × 10 <sup>4</sup> b
	187	1.57 c	28.54 b	4.6 × 10 <sup>4</sup> b
	375	1.00 d	53.37 c	4.5 × 10 <sup>4</sup> b
	750	NC	100	-
4. <i>Chaetomium fusiforme</i>	Testigo	1.59 a	-	NP
	93	0.80 b	57.22 a	NP
	187	0.07 c	94.35 b	NP
	375	NC	100	NP
	750	NC	100	NP
5. <i>Humicola fuscoatra</i>	Testigo	4.01 a	-	NP
	93	0.02 b	86.72 a	NP
	187	NC	100	NP
	375	NC	100	NP
	750	NC	100	NP
6. <i>Paecilomyces carneus</i>	Testigo	0.18 b	-	3.7 × 10 <sup>5</sup> a
	93	0.26 a	0	3.5 × 10 <sup>4</sup> b
	187	0.27 a	26.55 b	1.4 × 10 <sup>4</sup> b
	375	NC	100 c	-
	750	NC	100 c	-
7. <i>Paecilomyces lilacinus</i>	Testigo	1.82 a	-	1.3 × 10 <sup>6</sup> a
	93	0.34 b	58.70 a	4.8 × 10 <sup>5</sup> b
	187	0.25 b	77.85 b	5.7 × 10 <sup>4</sup> c
	375	0.10 c	87.53 c	5.1 × 10 <sup>4</sup> c
	750	0.03 d	91.59 c	4.8 × 10 <sup>4</sup> c
8. <i>Paecilomyces marquandii</i>	Testigo	1.46 a	-	2.4 × 10 <sup>6</sup> a
	93	0.51 b	59.26 a	1.5 × 10 <sup>6</sup> b
	187	0.30 c	75.34 b	1.2 × 10 <sup>5</sup> c
	375	0.11 d	84.89 c	8.1 × 10 <sup>4</sup> c
	750	0.04 d	88.41 c	4.8 × 10 <sup>4</sup> c
9. <i>Penicillium glabrum</i>	Testigo	2.34 a	-	1.6 × 10 <sup>5</sup> b
	93	1.42 b	68.43 a	2.1 × 10 <sup>5</sup> a
	187	NC	100	-
	375	NC	100	-
	750	NC	100	-

**CUADRO III.** EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PARAQUAT SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA ESPORULACIÓN EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Especie	Paraquat (mg/L)	TCD (cm <sup>2</sup> /día)	ICM (%)	Esporulación (Esporas/mL)
10. <i>Penicillium implicatum</i>	Testigo	1.60 a	-	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	93	0.70 b	77.14 a	1.2 × 10 <sup>5</sup> b
	187	0.69 b	93.65 b	3.5 × 10 <sup>4</sup> b
	375	NC	100	-
	750	NC	100	-
11. <i>Penicillium melinii</i>	Testigo	1.50 a	-	1.6 × 10 <sup>6</sup> b
	93	0.97 b	46.61 a	2.1 × 10 <sup>6</sup> a
	187	0.59 c	54.91 b	2.0 × 10 <sup>6</sup> ab
	375	0.48cd	62.34 b	1.1 × 10 <sup>6</sup> c
	750	0.41 d	77.43 c	7.5 × 10 <sup>5</sup> c
12. <i>Trichoderma aggressivum</i>	Testigo	11.08 a	-	3.2 × 10 <sup>6</sup> a
	93	4.16 b	88.91 a	2.3 × 10 <sup>4</sup> b
	187	0.12 c	99.79 b	1.0 × 10 <sup>4</sup> b
	375	NC	100	-
	750	NC	100	-
13. <i>Trichoderma spirale</i>	Testigo	13.1 a	-	1.7 × 10 <sup>5</sup> b
	93	1.0 b	93.21 a	1.7 × 10 <sup>6</sup> a
	187	NC	100	-
	375	NC	100	-
	750	NC	100	-

Medias (n = 4) con letras diferentes entre filas por especie, indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Las especies *Chaetomium fusiforme* y *Humicola fuscoatra* no produjeron esporas en el medio de cultivo empleado (NP). NC = no creció. TCD = tasa de crecimiento diaria en cm<sup>2</sup>/día. ICM (%) = inhibición del crecimiento micelial.

**CUADRO IV.** CONCENTRACIÓN EFECTIVA MEDIA (CE<sub>50</sub>) DEL PARAQUAT EN 13 CEPAS DE HONGOS SAPROBIOS DEL SUELO

Aislamiento	CE <sub>50</sub> (mg/L)	IC al 95% (mg/L)	Pendiente (M±EE)	Ecuación Probit	χ <sup>2</sup>	Pr>χ <sup>2</sup>
<i>Aspergillus candidus</i>	183.9 d	169.5-198.6	2.1 ± 0.1	Y = -4.7 + 2.1X	358	< 0.0001
<i>Aspergillus clavatus</i>	51.9 a	39.3-63.7	1.6 ± 0.1	Y = -2.9 + 1.6X	139.8	< 0.0001
<i>Aspergillus tamarii</i>	256.4 f	241.6-272.1	2.7 ± 0.1	Y = -6.6 + 2.7X	512.9	< 0.0001
<i>Chaetomium fusiforme</i>	86.1 b	79.9-91.5	4.7 ± 0.3	Y = -9.2 + 4.7X	170.3	< 0.0001
<i>Humicola fuscoatra</i>	48.9 a	34.8-59.1	4.0 ± 0.6	Y = -6.8 + 4.0X	42.1	< 0.0001
<i>Paecilomyces carneus</i>	210.7 e	204.4-220.1	12.3 ± 1.5	Y = -28.7 + 12.3X	61.9	< 0.0001
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	57.7 a	42.8-72	1.3 ± 0.1	Y = -2.3 + 1.3X	135.1	< 0.0001
<i>Paecilomyces marquandii</i>	51.4 a	34.8-67.6	1.1 ± 0.1	Y = -1.8 + 1.1X	103.2	< 0.0001
<i>Penicillium glabrum</i>	82.3 b	75.5-86.3	8.5 ± 1.5	Y = -16.3 + 8.5X	32.5	< 0.0001
<i>Penicillium implicatum</i>	55.2 a	44.5-64.3	3.1 ± 0.3	Y = -5.4 + 3.1X	98.4	< 0.0001
<i>Penicillium melinii</i>	130.1 bc	100.6-157.7	0.8 ± 0.1	Y = -1.8 + 0.8X	83.1	< 0.0001
<i>Trichoderma aggressivum</i>	56.2 a	37.1-66.8	5.5 ± 1.1	Y = -9.6 + 5.5X	21.2	< 0.0001
<i>Trichoderma spirale</i>	31.5 a	13.2-45.7	3.1 ± 0.6	Y = -4.7 + 3.1X	22.9	< 0.0001

Letras diferentes muestran diferencias significativas de acuerdo con el traslape de los intervalos de confianza. IC = intervalo de confianza al 95 %. M = media, EE = error estándar.

que las más altas fueron encontradas en *P. carneus* (210.7 mg/L) y *A. Tamaritii*. En esta última se detectó la mayor concentración efectiva media (256.4 mg/L), misma que corresponde aproximadamente a una séptima parte de la concentración de paraquat que se aplica en el campo (1500 mg/L).

## DISCUSIÓN

En este estudio se constató que para las cepas estudiadas la atrazina es menos tóxica que el paraquat, ya que ninguna de las especies evaluadas fue inhibida totalmente en la dosis más alta de atrazina (3750 mg/L). Estos resultados son contrarios a los de Rachappa *et al.* (2007) quienes reportaron que la dosis de campo de atrazina inhibe el crecimiento *in vitro* e *in situ* de hongos saprobios del suelo. En un estudio *in vitro*, Desai y Kulkarni (2004) encontraron un 69.9 y 16.0 % de inhibición en el crecimiento micelial de *Trichoderma harzianum* al adicionar 2000 mg/L de atrazina al APD a las 24 y 96 h de evaluación, respectivamente. Por su parte Prabhu *et al.* (2007) evaluaron el efecto de una serie de pesticidas, entre ellos la atrazina, en el crecimiento *in vitro* de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *B. brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*. Los resultados indicaron una reducción significativa en el crecimiento radial de la colonia, producción de biomasa y esporulación.

En otro estudio, Rodríguez *et al.* (1967) reportaron un incremento en la producción de micelio de *Trichoderma viride* al ser cultivado en un medio suplementado con 80 mg/L de atrazina, este resultado difiere de los del presente estudio, debido a que las cepas estudiadas del género *Trichoderma* (*T. viride* y *T. spirale*) fueron las más susceptibles tanto a la atrazina como al paraquat. Esta diferencia puede radicar en la concentración de atrazina estudiada, la cual fue cinco veces menor a la utilizada en el presente estudio, así como a que se emplearon cepas diferentes de la misma especie. Al respecto, Tanney y Hutchison (2010) mencionaron que la sensibilidad y la tolerancia de los hongos saprobios del suelo hacia un pesticida es una adaptación especie-cepa-dependiente, además puede variar de una población a otra (Zain *et al.* 2013a) y de un herbicida a otro (Zain *et al.* 2013b).

Por el contrario, para la cepa de *P. carneus* se encontró que a las concentraciones más bajas estudiadas (468 y 937 mg/L), la atrazina estimuló su tasa de crecimiento. Este efecto ha sido reportado por Alvarez *et al.* (1990) en la especie queratolítica

*Microsporium fulvum* cultivada en un medio con concentraciones de atrazina en un rango de 5 a 50 mg/L. Además de la atrazina, se han reportado otros pesticidas que a bajas concentraciones estimulan el crecimiento de algunos hongos saprobios del suelo. Stamatiu (2013) detectó un aumento en la tasa del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* (5.1 mm/d) en medio mínimo (MM) suplementado con 250 (9.9 mm/d) y 500 mg/L (9.5 mm/d) de endosulfan (insecticida) y un incremento del 60 % en *Fusarium oxysporum* en APD suplementado con 0.12 mg/L del herbicida haloxifop-metil. Por su parte Ceballos (2005) reportó que el herbicida flumetsulam estimuló el crecimiento de *F. oxysporum* en 10 y 20 % por efecto de la adición de 0.08 y 0.12 mg/L del herbicida al medio de cultivo.

Respecto al paraquat, los resultados obtenidos con las dos especies del género *Trichoderma*, coinciden con el trabajo de Wilkinson y Lucas (1969), quienes por primera ocasión destacaron la alta toxicidad del paraquat sobre la tasa de crecimiento de *T. viride* a concentración de 100 mg/L en el medio de cultivo, dosis similar a la más baja evaluada en este trabajo. Posteriormente, Abdel-Mallek (1987) corroboró la alta toxicidad del paraquat sobre hongos saprobios de suelo, aún a concentraciones muy bajas (10, 50 y 100 mg/L) que inhibieron el desarrollo de *Myrothecium verrucaria*, *Humicola* spp., *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra*, *H. grisea*, *Chaetomium* spp. y *C. globosum*. Recientemente, Zain *et al.* (2013b) evaluaron el efecto del paraquat sobre el crecimiento *in vitro* de *Mucor* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp., los resultados mostraron inhibición alta del crecimiento micelial (entre el 70 y 100 %) al ser expuestos a concentraciones de 0.44, 0.88 y 1.76 mg/mL).

Del mismo modo Mensin *et al.* (2013) reportaron una fuerte toxicidad del paraquat al inhibir el crecimiento micelial de los hongos nematófagos *Arthrobotrys oligospora* (80 %), *A. conoides* (100 %), *A. musiformis* (100 %) y *A. thumassium* (100 %) en la concentración más baja evaluada (575 mg/L), que es similar a la dosis más alta empleada en este estudio (750 mg/L). Por el contrario Leach *et al.* (1991) al evaluar concentraciones de 0 a 64 mg/L de paraquat y otros herbicidas sobre el crecimiento *in vitro* de hongos y bacterias asociadas al cultivo de papa, no encontraron diferencias significativas en el crecimiento radial de los hongos. Esto pudo deberse a que las concentraciones empleadas por Leach *et al.* (1991) fueron muy bajas comparadas con las aplicadas en campo y a que el herbicida fue esterilizado conjuntamente con el medio de cultivo,

proceso en el cual el ingrediente activo pudo haberse transformado o degradado. En este tipo de estudios es necesario evitar las alteraciones de las propiedades químicas de los compuestos evaluados por efecto de la esterilización. Por lo tanto, algunos autores (Desai y Kulkarni 2004, Tanney y Hutchison 2010, Alves y Monteiro 2011) mencionan que la manera apropiada de adicionar el herbicida al medio de cultivo es después de su esterilización, entre 45 y 50 °C.

Con la alta diversidad fúngica existente en el suelo es de esperar diferencias entre la susceptibilidad a un contaminante. Smith y Lyon (1976) mencionan que los hongos mucorales (como *Mucor hiemalis* y *Zygorhynchus heterogamous*) son considerablemente menos susceptibles al paraquat que los hongos imperfectos (*Aspergillus niger* y *Penicillium frequentans*). Según los autores mencionados, estas diferencias pueden explicarse en parte por la capacidad de los hongos para absorber el herbicida. Los mucorales absorben dos veces más paraquat que los hongos imperfectos. Sin embargo, esta situación no concuerda con lo descrito por Zain *et al.* (2013b) al emplear otra cepa de *Mucor* spp. que resultó muy susceptible. Algunos autores como Alvarez *et al.* (1990) sugieren que la susceptibilidad de los hongos microscópicos al paraquat está relacionada con la acumulación del herbicida en el micelio, la cual depende de la velocidad a la que el herbicida se transporta en las hifas y de la velocidad a la que se degrada en el micelio.

Para la mayoría de las cepas estudiadas la abundancia de esporas se vio negativamente afectada por la atrazina y el paraquat. Resultados similares han sido reportados para otros hongos saprobios del suelo, Rachappa *et al.* (2007) reportaron hasta un 60 % en la reducción de la producción de esporas *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* por efecto de la atrazina a dosis de campo. Asimismo, Jones y Williams (1971) al evaluar la toxicidad del paraquat sobre *Septoria nodorum* y *S. tritici*, encontraron una inhibición muy alta (> 80 %) a concentración de 100 mg/L de paraquat. En un estudio reciente, Mensin *et al.* (2013) hallaron que el paraquat, a concentración de 575 mg/L, inhibió en 100 % la esporulación de los hongos nematófagos del género *Arthrobotrys* spp. y *Paecilomyces* spp., y en menor cantidad la esporulación de *Pochonia* spp. La reducción en la producción de esporas puede ser considerada como un efecto subletal de los herbicidas sobre los hongos saprobios del suelo (Schein *et al.* 1984). Según algunos estudios los herbicidas ejercen un efecto negativo sobre las células fúngicas al interrumpir la ruta de la formación del shikimato, además de que afectan la

síntesis de aminoácidos y folatos, lo que provoca una inhibición de la esporulación, la melanización y de la pigmentación de las colonias fúngicas (Nosanchuk *et al.* 2001, Tanney y Hutchison 2010).

Para los hongos saprobios del suelo la producción y germinación de esporas es importante para su supervivencia, reproducción y dispersión. La inhibición de cualquiera de estas fases y procesos biológicos por la aplicación de herbicidas puede repercutir sobre determinadas especies con importancia en el ámbito agrícola, tales como los hongos entomopatógenos de los géneros *Paecilomyces* y *Trichoderma*, empleados en el control biológico de insectos plaga, enfermedades y nemátodos (Argumedo *et al.* 2009, Carrión y Desgarenes 2012). Paralelamente, es afectada la actividad bioquímica, la diversidad y la estructura de la comunidad microbiana, que puede repercutir negativamente en la nutrición de las plantas (Saeki y Toyota 2004, Huang *et al.* 2009). Además de la atrazina y el paraquat, se han citado otros herbicidas tóxicos sobre hongos saprobios del suelo tales como: metolaclor, cloridazon, lenacil, glifosato, primeextra, clorosulfuron, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ametrina y trifluralin (Poprawski y Majchrowicz 1995, Fisher *et al.* 2000, Tsui *et al.* 2001, Mochi *et al.* 2005, Prabhu *et al.* 2007, Sebiomo *et al.* 2011).

Sin embargo, en el presente estudio se encontró que ciertas especies como *P. glabrum* y *T. spirale* incrementaron significativamente su producción de esporas al crecer bajo la concentración más baja de atrazina (468 mg/L) y paraquat (93 mg/L). Este incremento en la producción de esporas no se relacionó con la TCD debido a que esta se redujo significativamente por efecto de ambos herbicidas. El incremento en la producción de esporas de *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. por estrés inducido por atrazina y paraquat no ha sido reportado anteriormente. Sin embargo, existen estudios que han confirmado que la adición de ciertos xenobióticos al medio de cultivo de hongos microscópicos filamentosos puede resultar en un incremento en la esporulación. Al respecto, Mensin *et al.* (2013) reportaron un aumento en la producción de conidiosporas de una cepa de *Paecilomyces* sp. al adicionar 20.8 y 31.2 mg/L de lambda-cialotrina (insecticida) al medio de cultivo.

Del mismo modo, Kollmann *et al.* (2003), al evaluar la toxicidad del surfactante nonilfenol en hongos microscópicos del suelo, encontraron un incremento (ocho veces mayor) en la producción y germinación de esporas de *F. oxysporum* en cultivos con medio mínimo contaminado con  $5^{-6}$  M (1.10 mg/L) del surfactante. Posteriormente Kollmann *et al.* (2004), evaluaron la toxicidad del endectocida ivermectina sobre hongos

filamentosos y encontraron que *Phanerochaete chrysosporium* y *Mucor racemosus* incrementaron dos veces su esporulación respecto al testigo (sin ivermectina), en cultivos con medio mínimo suplementado con  $10^{-4}$  M de ivermectina (87.5 mg/L).

El mecanismo implicado en el incremento de la producción de esporas en hongos saprobios del suelo por efecto del estrés por xenobióticos aún no ha sido descrito. Sin embargo, es necesario destacar que cada especie y cepa responde de manera diferente ya sea en el ambiente o bajo condiciones *in vitro* (Kollmann *et al.* 2003, 2004). Es de esperar que el mecanismo de acción de los pesticidas sobre los hongos saprobios del suelo sea mediado por diversas rutas metabólicas y fisiológicas (Tanney y Hutchison 2010), las cuales deben ser estudiadas a profundidad para su comprensión.

Por otra parte, a nivel de campo la toxicidad de los herbicidas sobre los hongos saprobios del suelo ha sido pobremente documentada. Mandic *et al.* (2005) reportaron que en las etapas iniciales del cultivo de manzana los herbicidas afectaron negativamente la abundancia de hongos en el suelo, en donde el paraquat fue uno de los que ocasionó mayor efecto negativo. En contraposición, Mekwatanakarn y Sivasithamparam (1987) encontraron que la aplicación del paraquat en el suelo incrementó la población de hongos comparado con suelo sin herbicida. La divergencia en estos resultados podría deberse a las dosis empleadas, en el último estudio se aplicó 1 mg/L de paraquat, cantidad muy baja en comparación con las concentraciones reales aplicadas en campo (1500 mg/L), aunado a que el herbicida al hacer contacto con el suelo se diluye, volatiliza o en algunos casos se fotodegrada.

La  $CE_{50}$  ha sido un parámetro empleado para determinar la toxicidad de un contaminante sobre organismos fúngicos (Joshi y Gupta 2008, Molina y Melo 2010). La atrazina resultó menos tóxica que el paraquat sobre las especies evaluadas, excepto para *T. spirale* y *T. aggressivum* que presentaron los valores más bajos en ambos herbicidas, lo que demuestra que estas especies son muy susceptibles para ambos. No existen referencias para comparar los resultados de  $CE_{50}$  para atrazina y paraquat, únicamente se describen  $CE_{50}$  para el herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) el cual oscila entre 188 mg/L para inhibir el 50 % de las unidades formadoras de colonias de *Aspergillus* spp. (Joshi y Gupta 2008), y para algunos isotiocianatos empleados para el control de *Rhizoctonia solani* donde la  $CE_{50}$  es de 70 mg/L (Molina y Melo 2010).

Respecto a los hongos tolerantes a pesticidas, en trabajos previos se ha descrito la capacidad de

algunas especies del género *Paecilomyces* para biotransformar fungicidas, herbicidas e insecticidas. Tal es el caso de *P. lilacinus*, que es capaz de biotransformar los fungicidas bifenil y 2,4-hidroxibifenilo en derivados menos tóxicos, vía fisión de anillos aromáticos (Gesell *et al.* 2001). Por su parte, Romero *et al.* (2009) reportaron la capacidad de *P. lilacinus* para biotransformar el herbicida isoproturon en sus derivados MDIPU [3-(4-isopropilfenil)-metilurea] y DDIPU [3-(4-isopropilfenil)-urea] mediante reacciones de metilación.

Con estos antecedentes, es factible que las especies que resultaron tolerantes a los herbicidas, como *P. carneus*, *P. lilacinus*, *P. marquandii* y *A. tamarii* sean capaces de metabolizar la atrazina y el paraquat a compuestos menos tóxicos y emplearlos como fuente de carbono. Lo anterior debido a que su TCD y la  $CE_{50}$  las ubican como las cepas con mayor resistencia a los herbicidas estudiados. Este trabajo provee la plataforma para continuar con el estudio de cepas nativas y profundizar en el tema de la respuesta fisiológica de hongos saprobios del suelo ante el estrés por herbicidas.

## CONCLUSIONES

La complejidad del sistema edáfico y el costo de establecer estudios a gran escala pone en relieve la necesidad de llevar a cabo investigaciones sobre toxicidad a nivel laboratorio como preámbulo para conocer las alteraciones que los herbicidas tienen en la microbiota a nivel de campo. Los hongos saprobios del suelo presentaron una respuesta diferenciada ante la presencia de la atrazina y del paraquat. La tasa de crecimiento diaria y la abundancia de esporas fueron los parámetros que se vieron más afectados en la mayoría de las especies por la presencia de los dos herbicidas utilizados en el estudio. Sin embargo, la respuesta fisiológica de algunas especies (*Penicillium glabrum* y *Trichoderma viride*) respecto al estrés por ambos herbicidas, resultó en un incremento en la producción de esporas. Este fenómeno debe ser estudiado con mayor profundidad para comprender el mecanismo que regula esta respuesta fisiológica. De acuerdo con los bioensayos dosis respuesta, las especies del género *Paecilomyces* fueron las más tolerantes a la atrazina; para el caso del paraquat, la especie *A. tamarii* fue la más tolerante al presentar la mayor  $CE_{50}$ . Estas especies son candidatas para estudiar su potencial en la biodegradación de atrazina y paraquat, así como para ser empleadas en estrategias de micorremediación de ambientes contaminados por atrazina.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado mediante el proyecto CB No. 169124. El primer autor agradece al CONACyT por la beca otorgada para sus estudios de doctorado.

## REFERENCIAS

- Abdel-Mallek A.Y. (1987). Effect of some herbicides on cellulose-decomposing fungi in Egyptian soil. *Zentralbl. Mikrobiol.* 142, 293-299.
- Adami H.O., Berry L.S.C., Breckenridge B.C., Smith L.L., Swenberg A.J., Trichopoulos D., Weiss S.N. y Pastoor P.T. (2011). Toxicology and epidemiology: improving the science with a framework for combining toxicological and epidemiological evidence to establish causal inference. *Toxicol. Sci.* 22, 223-234.
- Álvarez D.P., Luque A.G. y Gamberale M.E. (1990). Resistencia de cepas de *Microsporium fulvum* a herbicidas preemergentes. *Ciencia del Suelo* 8, 25-29.
- Alves B.A.A. y Monteiro A.C. (2011). Sensibilidade de fungus entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. *Bragantia* 70, 361-369.
- Argumedo D.R., Alarcón A., Ferrera C.R. y Peña C.J.J. (2009). El género *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánico e inorgánico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25, 257-269.
- Berry C., La-Vecchia C. y Nicotera P. (2010). Paraquat and Parkinson's disease. *Cell Death Differ.* 17, 1115-1124.
- Brodkin M.A., Madhoun H., Rameswaran M. y Vátnick I. (2007). Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 80-84.
- Carrión G. y Desgarennes D. (2012). Efecto de *Paecilomyces lilacinus* en nemátodos de vida libre asociados a la rizósfera de papas cultivadas en la región del Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30, 86-90.
- Ceballos C.R.E. (2005). Aplicación de herbicidas en trébol rosado y su incidencia en las interacciones planta-hongos fitopatogénos. Tesis de doctorado. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 88 pp.
- Cejudo E.E., Ramos V.A., Esparza G.F., Moreno C.P. y Rodríguez V.R. (2008). Short-term accumulation of atrazine by three plants from a wetland model system. *Arch. Environ. Con. Tox.* 56, 201-208.
- Desai S.A. y Kulkarni S. (2004). Effect of fungicides, insecticides and weedicides on the growth and sporulation of native *Trichoderma harzianum* Rifai. *Karnataka J. Agric. Sci.* 17, 57-62.
- Dinis O.R.J., Remiao F., Carmo H., Duarte J.A., Navarro S.A., Bastos M.L. y Carvalho F. (2006). Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 27, 1110-1122.
- El-Ghany A.T.M. y Tayel A.A. (2009). Efficacy of certain agrochemicals application at field rates on soil fungi and their ultra-structures. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 5, 150-160.
- Fisher P.J., Marriott M.W., Mitchell J.I. y Lappin S.H.M. (2000). Some physiological effects of the herbicides ( $\pm$ )-MCPP and 2, 4-D on four aquatic hyphomycetes and one terrestrial fungus. *Bot. J. Scotland* 52, 213-225.
- Frey S.D., Elliott E.T. y Paustian K. (1999). Bacterial and fungal abundance and biomass in conventional and non-tillage agro ecosystems along two climatic gradients. *Soil Biol. Biochem.* 31, 573-585.
- Gesell M., Hammer E., Specht M., Francke W. y Schauer F. (2001). Biotransformation of Biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1551-1557.
- Gindin G., Geschtovt N.U., Raccach B. y Barash I. (2000). Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to different development stages of the silverleaf whitefly *Bemisia argentifolli*. *Phytoparasitica* 28, 1-11.
- Gleason F.H., Crawford J. W., Neuhauser S., Henderson L.E. y Lilje O. (2010). Resource seeking strategies of zoosporic true fungi in heterogeneous soil habitats at the microscale level. *Soil Biol. Biochem.* 45, 79-88.
- González A.C., Robledo M.L., Medina D.I., Velázquez F.J., Girón P.M., Quintanilla V.B., Ostrosky W.P., Pérez H.N. y Rojas G.A. (2010). Patrón de uso de plaguicidas en Nayarit, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26, 221-228.
- González M. L. C. y Hansen A. M. (2009). Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR-063 Guasave, Sinaloa. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* 26, 587-599.
- GraphPad InStat. GraphPad Software. La Joya, California, E.U.A. 2000. Programa en CD.
- Hayes T.B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Moriega N., Stuart A.A. y Vonk A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5476-5480.
- Heredia A.G.P. y Arias M.R.M. (2008). Hongos saprobios y endomicorrizógenos en suelos. En: Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz: biodiversidad, manejo y conservación (R.H. Manson, O.V. Hernández, S. Gallina y K. Mehlreter, Eds.). Instituto de Ecología A.C. (INECOL) e Instituto Nacional de Ecología (INESEMARNAT), México, pp. 193-213.
- Hernández H.N.A. y Martínez A.M. (2006). Intoxicación por paraquat. *Salud en Tabasco* 1, 302-305.

- Huang H., Zhang S., Wu N., Luo L. y Cristie P. (2009). Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities and soil microbial community structure. *Soil Biol. Biochem.* 41, 726-734.
- Jones G.D. y Williams J.R. (1971). Effect of paraquat on growth and sporulation of *Septoria nodorum* and *Septoria tritici*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57, 351-357.
- Joshi N. y Gupta D. (2008). Soil microflora responses following the exposure to 2, 4-D. *J. Environ. Biol.* 29, 211-214.
- Kollmann A., Touton I., Brault A., Alvinerie A., Galtier P. y Mougin C. (2004). Effect of the endectocide ivermectin on filamentous fungi. *Environ. Chem. Lett.* 1, 215-218.
- Kollmann A., Brault A., Touton I., Dubroca J., Chaplain V. y Mougin C. (2003). Effect of nonylphenol surfactant on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *J. Environ. Qual.* 32, 1269-1276.
- Leach S.S., Murdoch C.W. y Gordon C. (1991). Response of selected soil borne fungi and bacteria to herbicide utilized potato crop management system in maine. *Am. Potato J.* 68, 269-278.
- Mandic L., Dukic D. y Dordevic S. (2005). Soil fungi as indicator of pesticides soil pollution. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad* 109, 97-102.
- Mekwatanakarn P. y Sivasithamparam K. (1987). Effect of certain herbicides on soil microbial populations and their influence on saprophytic growth in soil and pathogenicity of take-all fungus. *Biol. Fert. Soils.* 5, 175-180.
- Mensin S., Soyong K., McGovern R.J. y Toanun C. (2013). Effect of agricultural pesticides on the growth and sporulation of nematophagous fungi. *Journal of Agricultural Technology* 9, 953-961.
- Mochi D.A., Monteiro A.C. y Barbosa J.C. (2005). Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotrop. Entomol.* 34, 961-971.
- Molina V.L.F. y Melo M.S.E. (2010). Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub> de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agron. Colom.* 28, 235-244.
- Nosanchuk J.D., Ovalle R. y Casadevall A. (2001). Glyphosate inhibits melanization of *Cryptococcus neoformans* and prolongs survival of mice after systemic infection. *J. Infect. Dis.* 183, 1093-1099.
- Poprawski T.J. y Majchrowicz I. (1995). Effect of herbicides on *in vitro* vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi. *Crop Prot.* 14, 81-87.
- Prabhu T., Srikanth J. y Santhalakshmi G. (2007). Compatibility of selected pesticides with three entomopathogenic fungi of sugarcane pest. *J. Biol. Control* 21, 73-82.
- Rachappa V., Lingappa S. y Patil R.K. (2007). Effect of agrochemicals on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. *Karnataka J. Agric. Sci.* 20, 410-413.
- Rasband W.S. (2011). Image J, U. S. National Institutes of Health Bethesda, Maryland, E.U.A. [en línea]. <http://imagej.nih.gov/ij/> 05/11/2011.
- Raymundo R.E., Nikolskii G.I., Duwig C., Prado P.B.L., Hidalgo M.I., Gavi R.F. y Figueroa S.B. (2009). Transporte de atrazina en un andosol y un vertisol de México. *Interciencia* 34, 330-337.
- Rodríguez K.R., Curl E.A. y Funderburk H.H. (1967). Effect of atrazine on growth response of *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.* 13, 1343-1349.
- Romero M.C., Urritia M.I., Reinoso E.H. y Moreno K.A. (2009). Wild soil fungi able to degrade the herbicide isoproturon. *Revista Mexicana de Micología* 29, 1-7.
- Saeki M. y Toyota K. (2004). Effect of bensulfuron-methyl (a sulfonylurea herbicide) on the soil bacteria community of a paddy soil microcosm. *Biol. Fert. Soils.* 40, 110-118.
- Sahid I.B., Lyon A.J.E. y Smith S.N. (1981). The effect of bipyridyl herbicides on the loss of nutrients from fungi. *New Phytol.* 89, 401-409.
- SAS Institute. (2000). The SAS system for windows 8e. Cary, N.C., E.U.A. Programa en CD.
- Sebiomo A., Ogundero V.W. y Bankole A. (2011). Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 770-778.
- Schein R.D., Nelson G.G., Royer M.H. y Borges O. (1984). Comparison of the effect of sublethal doses of triadimefon to those of rate-reducing resistance to *Erysiphe graminis* in wheat. *Phytopathology* 74, 452-456.
- Simpkins J.W., Swenberg J.A., Weiss N., Brusick D., Eldridge J.C., Stevens J.T., Hand R.J., Hovey R.C., Plant T.M., Pastoor T.P. y Breckenridge C.B. (2011). Atrazine and breast cancer: a framework assessment of the toxicological and epidemiological evidence. *Toxicol. Sci.* 123, 441-459.
- Smith S.N. y Lyon A.J.E. (1976). The uptake of paraquat by soil fungi. *New Phytol.* 76, 749-784.
- Soto G.J.L., Andrade S.M., Mestas Z.P., Motta O.M. y Soto G.H.H. (2009). Impacto de herbicidas sobre microorganismos disolventes de fosfatos en suelo rizosférico de plantas de *Solanum tuberosum*. *Revista Teoría y Praxis Investigativa* 5, 11-20.
- Stamatiu S.K. (2013). Tolerancia y biodegradación de plaguicidas con hongos filamentosos. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos, Texcoco, Estado de México, México. 157 pp.

- Tanney J.B. y Hutchison L.J. (2010). The effects of glyphosate on the *in vitro* linear growth of selected microfungi from a boreal forest soil. *Can. J. Microbiol.* 56, 138-144.
- Tsui C.K.M., Hyde K.D. y Hodgkiss I.J. (2001). Effect of glyphosate on lignicolous freshwater fungi of Hong Kong. *Sydowia* 53, 167-174.
- Wilkinson V. y Lucas R.L. (1969). Effects of herbicides on the growth of soil fungi. *New Phytol.* 68, 709-718.
- Zain M.N.M., Mohamad R.B., Sijam K., Mahbub M. y Awang Y. (2013a). Effects of selected herbicides on soil microbial populations in oil palm plantation of Malaysia: a microcosm experiment. *Afr. J. Microbiol Res.* 7, 367-374.
- Zain M.N.M., Mohamad R.B., Sijam K., Mahbub M. y Awang Y. (2013b). Effect of selected herbicides *in vitro* and in soil on growth and development of soil fungi from oil palm plantation. *Int. J. Agric. Biol.* 15, 820-826.
- Zamora G.N.F., García L.P., Ruiz L.M. y Salcedo P.E. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. *Agrociencia* 42, 185-192.