



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

TOLERANCIA Y BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS CON HONGOS FILAMENTOSOS

KATINA STAMATIU SÁNCHEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO

Diciembre 2013

La presente tesis titulada: TOLERANCIA Y BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS CON HONGOS FILAMENTOSOS

realizada por la alumna: KATINA STAMATIU SÁNCHEZ

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



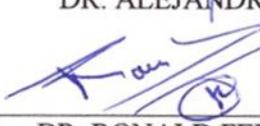
DR. JULIO SÁNCHEZ ESCUDERO

DIRECTOR DE
TESIS



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR



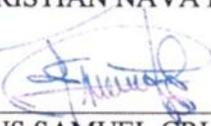
DR. RONALD FERRERA-CERRATO

ASESOR



DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

ASESOR



DR. JESUS SAMUEL CRUZ SÁNCHEZ

ASESOR



DRA. MARÍA DEL PILAR CASTILLO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2013

*Η γνώση δεν είναι ένα δοχείο που γεμίζει
αλλά μια φλόγα που ανάβει.*

Πλούταρχος

*I gnosi den ine ena doxio pu quemisi
ala mia floguia pu anabi*

Plutarxos

*"El conocimiento no es una vasija que se llena, sino
un fuego que se enciende"*

Plutarco

DEDICATORIA

A la vida.....

..... porque aunque me ha mostrado sus peores caras

aún tengo la oportunidad de conocerle las mejores!! ☺

A mi familia.....

..... mi esencia ♥

*A la memoria de todos los que se fueron mientras me dedicaba a llegar
hasta aquí †*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Dr. Alejandro Alarcón por apoyarme a realizar esta investigación y por su enorme paciencia para mostrarme el maravilloso mundo de la microbiología, antes totalmente desconocido para mí!

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por sus enseñanzas y regalarme un poco de su gran experiencia.

Al Dr. Julio Sánchez, por guiarme con entusiasmo y como buen consejero, aconsejarme siempre bien.

Al Dr. Cristian Nava y al Dr. Samuel Cruz, por apoyar con su experiencia en las áreas de micología y química analítica, puntos clave para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María del Pilar Castillo, por aceptar ser mi asesora y porque a pesar de la distancia siempre estuvo muy cerca de mi apoyándome y aportando gran conocimiento, gracias!

A la Dra. María Remedios Mendoza en el SARA, siempre le estaré agradecida por su gran apoyo en la parte analítica.

A las Doctoras Laura Delia Ortega, María Teresa Santillán, los Doctores Ariel Guzmán, Gabriel Otero, Carlos de León, porque a pesar de no ser mis asesores me apoyaron, me escucharon, me aconsejaron y me animaron a seguir adelante.

A todos los Doctores de Entomología y Acarología, gracias por la excelente formación y por su disposición a ayudarme siempre.

Al Dr. Manuel Sandoval Villa por hacer posible que llegara al final de este camino.

A la Dra. Rosalba Argumedo, muchas gracias por tus enseñanzas, esta investigación no habría prosperado sin tu amistad y ayuda.

A los M. C. Jorge Valdés y Carlos Castillo, sin su ayuda y experiencia muchos en el CP estaríamos perdidos!

Al Dr. Almaráz por apoyarme para continuar con esta investigación, a la Dra. Gabriela Sánchez Viveros por su amistad y su apoyo en Xalapa.

A las secretarías Silvia de Entomología, Liz y Lidia en Agroecología

A los laboratoristas Don Manuel Solano, Mundo Martínez, Lorenzo Viana, Fernando López y a nuestra secre estrella en Microbiología Rosario Galicia.

A la Lic. Carmen Padilla gracias por animarme siempre y hacerme fuerte en los tiempos difíciles, gracias a usted y las secretaria del área de Servicios Académicos por ayudarnos a no perdernos entre tanto papeleo.

A la familia Cornejo Silva, gracias por apoyarme cuando el panorama era negro.

A mis compañeros en el CP: Dionisio, Imelda, Lupita, Carmen, Nubia, Mario, Patricio, Benjamín, Jaime, Lili, Alma, Gaby, Chema, Aarón, gracias por ser parte de esta aventura y los lindos momentos.

A los compañeros en Microbiología: Miguel Ángel, Francisco, Yesica, Claudia Ordoñez, Alejandra, Yadira, Eliseo, Brigsania, Deisy, Apolinar, Salvador, Azarel, Tania, Claudia Rosas, Itzel, Samantha y Blanca.

A mis grandes amigos: Carlos, Hilda, Erika y Néstor, gracias por escucharme y levantarme cuando los ánimos estaba en los suelos, pero sobre todo por hacerme reír a carcajadas, sin esos momentos no hubiera sobrevivido a este proceso!

A mis queridos amigos de antaño: Jorgelina, Ivette, Javo, Danivid, Alicia, Moni, Adriana, Arturo, Aquiles y Ángel... quien dijo que los reencuentros no son lindos?!

Agradezco muy especialmente a la familia Ramos Gastelum gracias por hacerme sentir parte de su familia, gracias por su confianza y comprensión, sin su apoyo no hubiera podido culminar el Doctorado.

Y a todos los que contribuyeron directa e indirectamente, voluntaria o involuntariamente en la realización de este trabajo y durante mi camino en este tiempo, ya sea con apoyo, consejos o con una simple sonrisa... GRACIAS MIL!

Esta Tesis titulada: “Tolerancia y Biodegradación de Plaguicidas con Hongos Filamentosos” fue parcialmente financiada por el Proyecto SEP-CONACyT 79456 “**Simbiosis tripartita *Rhizobium-leguminosa- micorriza arbuscular* y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo**”, etapa tres.



TOLERANCIA Y BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS CON HONGOS FILAMENTOSOS

Katina Stamatiu Sánchez

Colegio de Postgraduados 2013

RESUMEN

El uso indiscriminado y las malas prácticas de manejo de plaguicidas en la producción agrícola, han llevado a la contaminación de todos los ambientes debido a su fácil dispersión y representan un riesgo para la salud humana y fauna silvestre. Plaguicidas como el endosulfán (EN), clorpirifós (CRP) y clorotalonil (CTL) son de amplio uso en diferentes cultivos, están catalogados como carcinogénicos y disruptores endócrinos. El uso de microorganismos para degradar plaguicidas ha permitido implementar tecnologías de biorremediación conocidos como “biobeds”, en las que se busca acelerar la biodegradación con biomezclas de suelo, paja de trigo y composta. En esta investigación se evaluó la tolerancia y capacidad de degradación de hongos filamentosos provenientes de suelo agrícola y paja de trigo hacia diferentes dosis de EN, CRP y CTL en comparación con *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trichoderma koningii* (TRI) y *Trametes versicolor* (TV) como cepas de referencia. Se realizaron dos fases experimentales: 1) aislamiento e identificación de cepas tolerantes a EN y 2) Evaluación de la tolerancia a EN, CRP y CTL. Se aislaron diez cepas del género *Fusarium* (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P, K14P, K1S, K11S y K3TP), una cepa de *Penicillium janthinellum* (K8S), una de *Mucor circinelloides* (K14S) y una de *Alternaria alternata* (K11TP). Las cepas en estudio difirieron en su tolerancia y desarrollo micelial (DM) en el medio de cultivo contaminado con los plaguicidas. El EN y el CRP afectaron el DM de las cepas en los primeros tres días, el CTL inhibió el DM durante todo el bioensayo (18 días). Las cepas PC, TRI, TV, K14S, K8S, K12P y K11TP fueron afectadas por los plaguicidas; sin embargo, se recuperaron notablemente por lo que tienen potencial para ser evaluadas en su capacidad para biodegradar plaguicidas.

Palabras clave: endosulfán, clorpirifós, contaminación, hongos filamentosos, tolerancia, biodegradación.

PESTICIDE TOLERANCE AND BIODEGRADATION BY FILAMENTOUS FUNGI

Katina Stamatiu Sánchez

Colegio de Postgraduados 2013

ABSTRACT

The abuse and inadequate management practices for pesticides in agricultural production have caused environmental contamination due to their easy dispersion that jeopardizes both human health and wild fauna. Pesticides such as endosulfan (EN) chlorpyrifos (CRP) and chlorothalonil (CTL) are widely utilized in crop production, but they are carcinogenic and endocrine disruptors. The use of microorganisms to degrade pesticides has allowed the application of bioremediation technologies like those known as “biobeds” in which the accelerated pesticide biodegradation is obtained by the utilization of biomixtures consisted in soil, straw and compost. This research evaluated the tolerance and the biodegradation capacity of filamentous fungi isolates from agricultural soil or wheat straw to several doses of EN, CRP and CTL by comparing them to three reference fungal strains *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trichoderma koningii* (TRI) and *Trametes versicolor* (TV). Two experimental stages were set, 1) isolation and identification of tolerant strains to EN, and 2) evaluation of the fungal tolerance to EN, CRP and CTL. There were isolated ten strains of *Fusarium* (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P, K14P, K1S, K11S and K3TP), one strain of *Penicillium janthinellum* (K8S), one of *Mucor circinelloides* (K14S) and one strain of *Alternaria alternata* (K11TP). All strains showed variations in their tolerance and mycelial growth (MG) in the contaminated medium with the pesticides. Insecticides, EN and CRP affected the MG during the first three days of growth meanwhile CTL inhibited the MG along experimentation (18 days). The strains PC, TRI, TV, K14S, K8S, K12P and K11TP were affected by the three pesticides; however, they totally recovered, thus, these strains have the potential for being assessed for their capacity for degrading pesticides.

Key words: endosulfan, chlorpyrifos, contamination, filamentous fungi, tolerance, biodegradation.

CONTENIDO

CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN, DISPERSIÓN, CONTAMINACIÓN, DEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN	3
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
2.1 Plaguicidas	5
2.1.1 Definición de plaguicidas	5
2.2 Mercado y consumo de plaguicidas	6
2.3 Historia de los plaguicidas	9
2.4 Clasificación de plaguicidas	12
2.4.1 Clasificación de plaguicidas según los organismos que controla y uso al que se destinan	12
2.4.2 Clasificación de plaguicidas por su persistencia en el ambiente y toxicidad	13
2.4.3 Clasificación de plaguicidas por su grupo químico y modo de acción	14
2.5 Dispersión y degradación	16
2.6 Contaminación y daños a la salud por plaguicidas	19
2.6.1 Contaminación por plaguicidas	20
2.6.2 Exposición, ingesta, bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas	22
2.6.3 Daños a la salud por plaguicidas	23
2.7 Endosulfán, Clorpirifós y Clorotalonil	24
2.7.1 Endosulfán	24
2.7.2 Clorpirifós	30

2.7.3 Clorotalonil	33
2.8 Biorremediación	36
2.8.1 Biobeds o sistemas de biopurificación (PBS)	40
2.9 Justificación	43
CAPÍTULO III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	45
3.1 Objetivo general	45
3.1.1 Objetivos particulares	45
3.2 Hipótesis general	46
3.2.1 Hipótesis particulares	46
CAPÍTULO IV. AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS TOLERANTES A ENDOSULFÁN	47
RESUMEN	47
ABSTRACT	48
4.1 Introducción	49
4.2 Materiales y Métodos	50
4.2.1 Colecta de suelo y paja	50
4.2.2 Aislamiento de hongos filamentosos	51
4.2.3 Purificación de cepas aisladas y cultivos monospóricos	51
4.2.4 Caracterización macroscópica, microscópica y molecular de cepas	52
4.2.5 Pruebas de patogenicidad	53
4.2.6 Plaguicida y cepas de referencia	55
4.2.7 Preselección de cepas tolerantes a endosulfán	56
4.2.8 Análisis estadístico	57

4.3 Resultados y Discusión	57
4.3.1 Aislamiento de cepas	57
4.3.2 Caracterización macroscópica microscópica y molecular	58
4.3.3 Pruebas de patogenicidad	76
4.3.4 Preselección de cepas tolerantes a endosulfán	81
4.4 Conclusiones	89
CAPÍTULO IV TOLERANCIA DE HONGOS FILAMENTOSOS ANTE ENDOSULFÁN, CLORPIRIFÓS Y CLOROTALONIL EN CONDICIONES <i>In Vitro</i>	91
RESUMEN	91
ABSTRACT	92
5.1 Introducción	93
5.2 Materiales y Métodos	94
5.2.1 Plaguicidas y cepas de hongos filamentosos	94
5.2.2 Pruebas de tolerancia a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil	95
5.2.3 Análisis estadístico	96
5.3 Resultados y discusión	96
5.3.1 Tolerancia al insecticida endosulfán (EN)	96
5.3.2 Tolerancia al insecticida clorpirifós (CRP)	103
5.3.3 Tolerancia al fungicida clorotalonil (CTL)	110
5.5 Conclusiones	119
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES GENERALES	120
LITERATURA CITADA	122
ANEXO I. Medios y Método de Desinfestación de Semillas de Trigo	149
ANEXO II. Secuencias de las Cepas y Descripción Morfológica.	151

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Generaciones, grupos químicos y uso de plaguicidas en la historia del hombre.	10
Cuadro 2.2 Clasificación de plaguicidas según su vida media.	14
Cuadro 2.3 Clasificación de plaguicidas según su toxicidad aguda.	14
Cuadro 2.4 Propiedades físicas y químicas de endosulfán, clorpirifós y clorotalonil.	26
Cuadro 2.5 Estudios de biodegradación de endosulfán con microorganismos.....	28
Cuadro 2.6 Estudios de biodegradación de clorpirifós con microorganismos.	33
Cuadro 2.7 Estudios de biodegradación de clorotalonil con microorganismos. ...	36
Cuadro 2.8 Degradación y acumulación de compuestos xenobióticos degradados por géneros de hongos filamentosos de interés en esta revisión.	39
Cuadro 4.1 Cepas fúngicas obtenidas de suelo agrícola, paja de trigo molida y trozos de paja de trigo, y afinidad taxonómica de acuerdo a sus secuencias moleculares.	58
Cuadro 4.2 Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas y tres cepas de referencia a 40 días de inoculadas en dos variedades de jitomate.	77
Cuadro 4.3 Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas y tres cepas de referencia inoculadas en plántulas de trigo.	79
Cuadro 4.4 Tasa máxima de crecimiento (T_{max}) y día en que se alcanzó el 95% de crecimiento máximo ($D_{95\%_{cmax}}$) de hongos filamentosos y cepas de referencia, después de la exposición ante tres dosis de endosulfán (EN) durante 18 días.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Valor comercial y consumo de plaguicidas en 2007.	7
Figura 2.2 Producción, valor comercial y consumo de plaguicidas en México.	8
Figura 2.3 Dispersión y degradación de plaguicidas en el ambiente.	17
Figura 2.4 Distribución total de DDT en aguas marinas superficiales.	21
Figura 2.5 Composición química del endosulfán y sus isómeros.	25
Figura 2.6 Posible ruta metabólica para endosulfán mediada por <i>Phanerochaete chrysosporium</i> BU-1.	29
Figura 2.7 Estructura química del clorpirifós.	30
Figura 2.8 Transformación de clorpirifós en el suelo.	32
Figura 2.9 Estructura química del clorotalonil y su principal metabolito.	34
Figura 2.10 Ruta metabólica propuesta para la degradación de clorotalonil, mediada por <i>Ochrobactrum lupini</i> TP-D1 en medio mineral modificado y contaminado con 50 mg L ⁻¹ del fungicida.	35
Figura 2.11 Esquema de una biobed.	41
Figura 4.1 Cepa K1P [<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg].	60
Figura 4.2 Cepa K9P [<i>Fusarium proliferatum</i> (Matsushima) Nirenberg].	61
Figura 4.3 Cepa K2P [<i>Fusarium succisae</i> (Schröter) Saccardo].	62
Figura 4.4 Cepa K13P [<i>Fusarium succisae</i> (Schröter) Saccardo].	63
Figura 4.5 Cepa K1S [<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl emmend. Snyder y Hansen].	65

Figura 4.6 Cepa K11S [<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Saccardo].	66
Figura 4.7 Cepa K8P [<i>Fusarium moniliforme</i> (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o <i>Giberella moniliformis</i>].	68
Figura 4.8 Cepa K12P [<i>Fusarium moniliforme</i> (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o <i>Giberella moniliformis</i>].	69
Figura 4.9 Cepa K3TP [<i>Fusarium moniliforme</i> (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o <i>Giberella moniliformis</i>].	70
Figura 4.10 Cepa K14P [<i>Fusarium moniliforme</i> (Sheldon) emend. Snyder & Hansen].	71
Figura 4.11 Cepa K8S (<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge).	73
Figura 4.12 Cepa K14S (<i>Mucor circinelloides</i> van Tieghem).	74
Figura 4.13 Cepa K3TP [<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler].	75
Figura 4.14 Pruebas de patogenicidad en invernadero con plántulas de jitomate.	78
Figura 4.15 Pruebas de patogenicidad de cepas fúngicas en plantas de trigo en condiciones de invernadero.	80
Figura 4.16 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo, expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis de endosulfán (mg L ⁻¹).	85
Figura 4.17 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis de endosulfán (mg L ⁻¹).	86

Figura 4.18 Dinámica de crecimiento de una cepa de hongos aislada de trozos de paja de trigo <i>Alternaria alternata</i> (K11TP) y tres cepas de referencia <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PC), <i>Trametes versicolor</i> (TV) y <i>Trichoderma koningii</i> (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis del insecticida endosulfán (mg L ⁻¹).	87
Figura 5.1 Efecto del endosulfán en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición..	98
Figura 5.2 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes endosulfán (mg L ⁻¹).	99
Figura 5.3 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), <i>Alternaria alternata</i> (K11TP) y tres cepas de referencia <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PC), <i>Trametes versicolor</i> (TV) y <i>Trichoderma koningii</i> (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes endosulfán (mg L ⁻¹) durante 18 días.	100
Figura 5.4 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de diez hongos filamentosos expuestos a dosis crecientes de endosulfán (mg L ⁻¹).	102
Figura 5.5 Efecto del clorpirifós en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición.	104
Figura 5.6 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorpirifós (mg L ⁻¹).	106

Figura 5.7 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), <i>Alternaria alternata</i> (K11TP) y tres cepas de referencia <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PC), <i>Trametes versicolor</i> (TV) y <i>Trichoderma koningii</i> (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorpirifós (mg L^{-1}) durante 18 días.	107
Figura 5.8 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de hongos aislados de paja molida de trigo, trozos de paja de trigo, suelo agrícola y cepas de referencia, expuestas a dosis crecientes de clorpirifós.	108
Figura 5.9 Efecto del fungicida clorotalonil en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición.	112
Figura 5.10 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorotalonil (mg L^{-1}).	113
Figura 5.11 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), <i>Alternaria alternata</i> (K11TP) y tres cepas de referencia <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PC), <i>Trametes versicolor</i> (TV) y <i>Trichoderma koningii</i> (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorotalonil (mg L^{-1}) durante 18 días.	114
Figura 5.12 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de hongos aislados de paja molida de trigo, trozos de paja de trigo, suelo agrícola y cepas de referencia, expuestas a dosis crecientes de clorotalonil.	116

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El uso de plaguicidas para el control de plagas en la producción agrícola y pecuaria, protección en zonas urbanas y control de vectores en el sector salud, provoca que cada año se viertan alrededor de 3 millones de toneladas de plaguicidas en el mundo (Grube *et al.* 2011). Los insecticidas endosulfán, clorpirifós, y el fungicida clorotalonil, son plaguicidas de muy amplio uso para diversos cultivos, la molécula parental o sus metabolitos son persistentes y están catalogados como carcinógenos y disruptores endócrinos (Greene y Pohanish 2005). Por su dispersión y persistencia, los plaguicidas están presentes en todos los ecosistemas y representan un riesgo para la salud humana (Chaudhry *et al.* 2002, Hu *et al.* 2009, Chopra *et al.* 2011).

Para disminuir los problemas de contaminación por plaguicidas, se han desarrollado técnicas de biorremediación mediante la selección y uso de microorganismos tolerantes y capaces de degradar estos compuestos xenobióticos. Los hongos ligninolíticos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*) poseen una gran capacidad de tolerancia y degradación a compuestos recalcitrantes hidrocarburos del petróleo y plaguicidas (Jauregui *et al.* 2003, Matsubara *et al.* 2006). Los géneros de hongos no ligninolíticos como *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma* también son capaces de tolerar y degradar compuestos contaminantes como hidrocarburos y plaguicidas (Mitra *et al.* 2001, Dan *et al.* 2006, Kim y Lee 2007, Argumedo-Delira *et al.* 2012). Sin embargo, existe poca información sobre la capacidad de degradación de endosulfán, clorpirifós y clorotalonil mediada por hongos de los géneros *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Alternaria*.

La investigación sobre las respuestas microbianas ante contaminantes, permiten el desarrollo de tecnologías para la biorremediación como las “biobeds” (Torstensson 2000,

Castillo *et al.* 2008, Karanasios *et al.* 2012). Para aumentar la capacidad y la velocidad de degradación de plaguicidas en las biobeds, se busca favorecer el desarrollo de hongos ligninolíticos. No obstante, el potencial de éstos puede ser inhibido por la invasión y competencia de otros microorganismos presentes en los diferentes sustratos que la conforman. Una alternativa para acelerar la biodegradación de plaguicidas en las Biobeds, es la adición al suelo con microorganismos predispuestos a la degradación de plaguicidas (Önneby *et al.* 2010, Karanasios *et al.* 2012). La presente investigación tiene como objetivo seleccionar hongos filamentosos provenientes de paja de trigo y suelo agrícola que sean capaces de tolerar y biodegradar plaguicidas como endosulfán, clorpirifós y clorotalonil, además de generar información sobre la tolerancia y capacidad de degradación de hongos no ligninolíticos presentes en paja de trigo y suelo.

CAPÍTULO II

PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN, DISPERSIÓN, CONTAMINACIÓN, DEGRADACIÓN Y BIORREMEDIACIÓN

RESUMEN

Desde la invención de los plaguicidas orgánicos modernos en 1950, se han liberado al ambiente todo tipo de biocidas para el control de plagas, tanto para el control de vectores de enfermedades como para la preservación de inmuebles e infraestructura urbana. El uso excesivo y las malas prácticas agrícolas relacionadas con la aplicación de plaguicidas, ha provocado contaminación de cuerpos de agua superficiales, mantos freáticos, agua marina y suelos. En un intento de mitigar los efectos negativos de los plaguicidas, se han desarrollado diferentes técnicas de biorremediación para la degradación rápida y efectiva de estos compuestos xenobióticos. Los microorganismos juegan un papel importante en la descontaminación de suelos, de los cuáles, varios géneros de hongos ligninolíticos y no ligninolíticos como *Phanerochaete chrysospprium*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium* y *Fusarium* han demostrado tolerancia y capacidad para degradar diferentes compuestos xenobióticos como los plaguicidas. En esta sección se ofrece un panorama general de los plaguicidas, su clasificación, dispersión, efectos en el ambiente y en el hombre, así como las propiedades y características más representativas de los plaguicidas en estudio (endosulfán, clorpirifós y clorotalonil). Además se describen algunas investigaciones sobre la respuesta de microorganismos ante diferentes contaminantes y en su aplicación en sistemas de biorremediación de plaguicidas.

Palabras clave: endosulfán, clorpirifós, clorotalonil, contaminación, hongos ligninolíticos, biodegradación.

CHAPTER II

PESTICIDES: CLASIFICATION, FATE, CONTAMINATION, DEGRADATION AND BIOREMEDIATION

ABSTRACT

Pesticides have been released to the environment to control several pests, disease vectors or to preserve wood or urban infrastructure. The abuse and inadequate agricultural practices in terms of pesticide applications have caused environmental issues in surface water bodies, groundwater, sea water, and soils. To reduce the environmental negative impacts of pesticides several bioremediation techniques have been implemented to allow faster and effective degradation of these xenobiotic compounds. Microorganisms play a significant role in soil decontamination, then ligninolytic and non-ligninolytic fungi such as *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Penicillium* and *Fusarium* are able to tolerate or degrade pesticides. This chapter shows an overview about pesticides in terms of their classification, dispersion, effects in the environment and human health, as well as on their main properties and characteristics of three pesticides (endosulfan, chlorpyrifos and chlorothalonil). In addition, some scientific reports are described about the response of microorganisms to several pollutants, and on their application in bioremediation systems directed to pesticides.

Keywords: endosulfan, chlorpyrifos, chlorothalonil, contamination, ligninolytic fungi, biodegradation.

2.1 PLAGUICIDAS

2.1.1 Definición de Plaguicidas

Los plaguicidas se definen como sustancias químicas usadas para prevenir, repeler o eliminar plagas, ya sean insectos, malezas, hongos, bacterias, nematodos o roedores (Plimmer 1992, Chopra *et al.* 2011). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) los define como cualquier sustancia o mezcla de ellas destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas, de animales, plantas u organismos indeseables que causan perjuicio o que interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera productos de madera o alimentos para animales. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte (WHO 1990, FAO 2003).

En México, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Además en esta definición se incluyen las sustancias defoliantes, las desecantes y los coadyuvantes (CICOPLAFEST 2004).

2.2 MERCADO Y CONSUMO DE PLAGUICIDAS

La agencia de protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) documentó un consumo aproximado de 2.37 millones de toneladas (ton) de plaguicidas en el mundo con un costo estimado de 39,434 millones de dólares en 2007, el consumo de plaguicidas en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) fue de 515 mil ton (Figuras 2.1A y 2.1B), donde los herbicidas tuvieron el mayor porcentaje de consumo, seguidos por otros plaguicidas, los insecticidas y por último, los fungicidas (Figuras 2.1C y 2.1D) (Grube *et al.* 2011).

Hernández-Antonio y Hansen (2011) documentan que en México la Secretaría de Energía (SENER) reportó un consumo de 95,025 ton de plaguicidas en 2006, de las cuáles México produjo 26,446 ton (Figuras 2.2A y 2.2B). En 2007 la producción total de plaguicidas se redujo a 18,242 ton con un valor comercial de 483.4 millones de pesos (Figuras 2.2A y 2.2B), lo que representó el 12.5% de la producción mundial (SENER 2008). En 2007, el 88.3% de la producción total nacional fueron herbicidas, mientras que el 5.5 y 2.6% fueron insecticidas y fungicidas respectivamente (Figura 2.2C). La reducción en la producción nacional de plaguicidas en 2007 produjo un aumento en las importaciones (25,400 ton), que junto con la producción nacional resultaron en un consumo aparente de 41,300 ton de plaguicidas (Figura 2.2D) (SENER 2008).

Pérez-Olvera *et al.* (2011) indican que el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reportó un total de 22.7 millones de hectáreas cultivadas en 2007. El mayor consumo de plaguicidas ocurre de manera general, en los estados de Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California Norte, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, México, Puebla y Oaxaca, en los que se registra el 80% del total de los plaguicidas usados (Albert 2005).

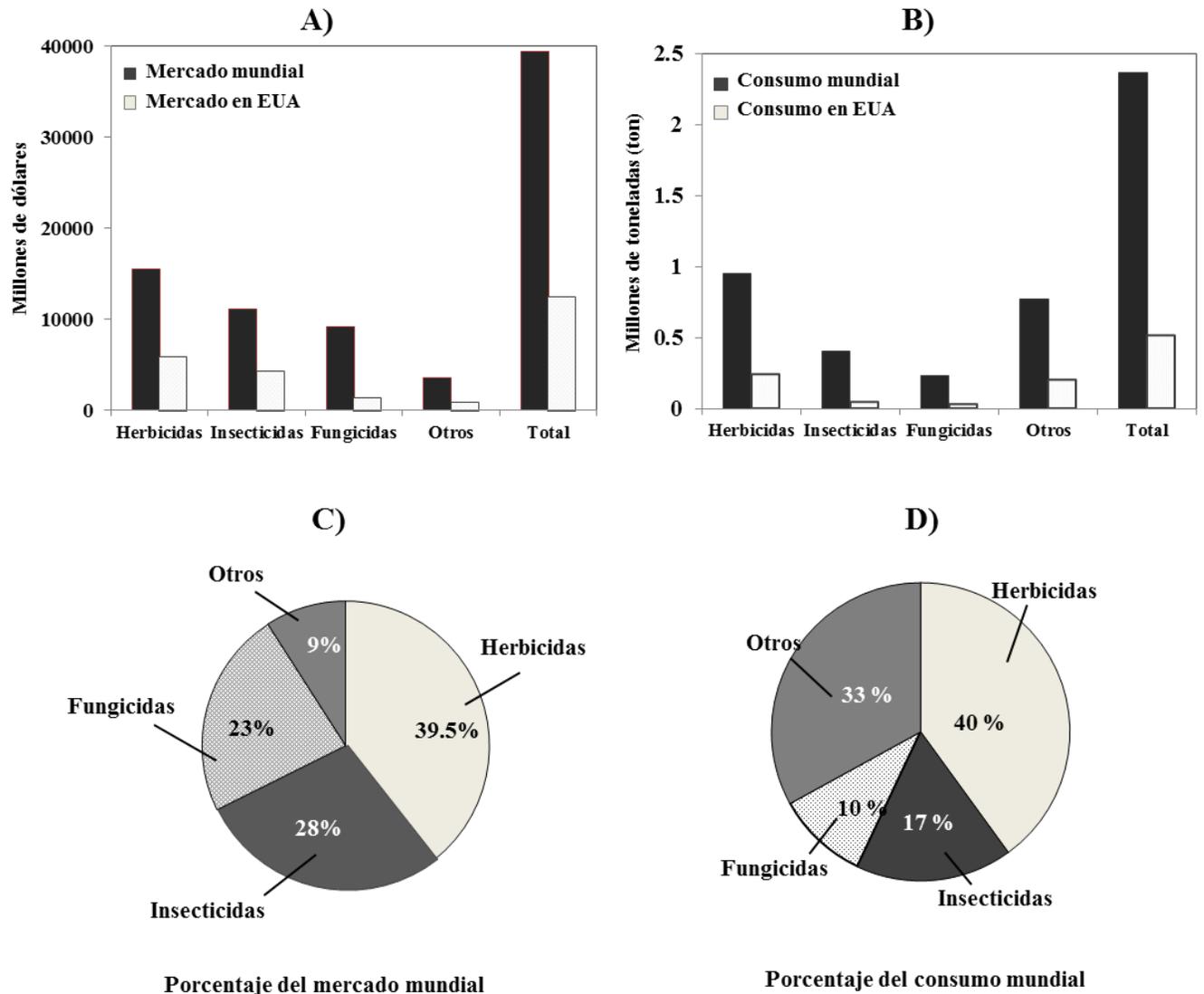


Figura 2.1 Valor comercial y consumo de plaguicidas en 2007. A) Mercado total de plaguicidas en el mundo y Estados Unidos de Norteamérica (EUA). B) Consumo total de plaguicidas en el mundo y en EUA. C) Porcentajes de los diferentes tipos de plaguicidas con respecto al mercado mundial. D) Porcentajes de los diferentes tipos de plaguicidas con respecto al consumo mundial. (Fuente: Grube *et al.* 2011).

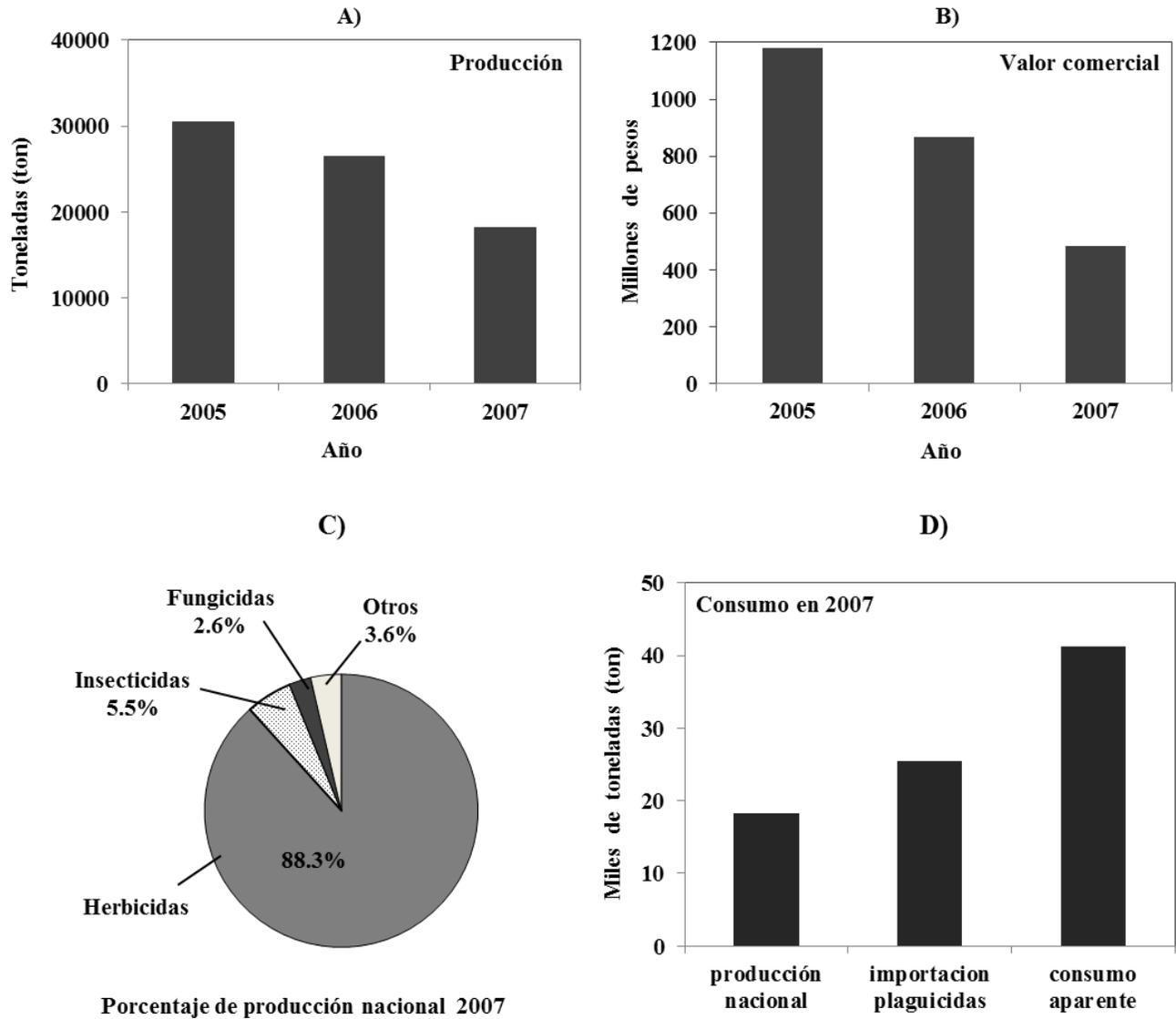


Figura 2.2 Producción, valor comercial y consumo de plaguicidas en México. A) Producción nacional de plaguicidas. B) Valor comercial de plaguicidas. C) Porcentajes de los diferentes tipos de plaguicidas con respecto a la producción nacional en 2007. D) Producción, importación y consumo aparente en México durante 2007. (Fuente: SENER 2008).

2.3 HISTORIA DE LOS PLAGUICIDAS

El uso de plaguicidas, su producción y comercialización parte inicialmente con los materiales inorgánicos, botánicos, continuando con compuestos orgánicos, carbamatos, piretroides, microbiológicos, hasta los neonicotinoides (Cuadro 2.1) (Casadei 2003)

Los compuestos inorgánicos de la primera generación se usaban desde el año 1000 AC., y hasta la primera década del siglo XX. Los griegos utilizaban sulfuro, y los chinos ya usaban el arsénico, el azufre y mezclas de alquitrán y azufre para el control de plagas (Bohmont 2007). Más tarde se utilizaron el Verde de Paris (mezcla de cobre y arsénico) para controlar al escarabajo de la papa en Estados Unidos de Norteamérica (EUA) mientras en Francia se utilizó el caldo Bordelés (sulfato de cobre e hidróxido de calcio) como fungicida en vid (Segura-Miranda 1985, Hewitt 1998, Bohmont 2007). Ya en el siglo XX se formulaban herbicidas inorgánicos como el sulfato de cobre y surgieron algunos compuestos orgánicos como paradiclorobenceno, naftalina y los fumigantes bromuro de metilo y cloruro de etileno; para 1915, comenzaron a formularse fungicidas orgánicos a base de mercurio, producidos por grandes compañías agroquímicas (Segura-Miranda 1985, Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994, Ware 1994).

En 1939 con el descubrimiento del DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) inició la segunda generación de plaguicidas, siendo la más exitosa para el control de plagas agrícolas y transmisores de enfermedades de importancia para la salud pública como el tifo y la malaria (Casadei 2003). Después del DDT, hexaclorociclohexano (HCH) y el lindano, surgieron otros plaguicidas organoclorados (OC) como el endosulfán para el control de plagas del algodón y café (Casadei 2003). Hacia 1950 surgen los plaguicidas organofosforados (OP) con acción insecticida, nematicida, fungicida y herbicida (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994).

Cuadro 2.1. Generaciones, grupos químicos y uso de plaguicidas en la historia del hombre

Generación	Grupo Químico	Periodo/ Año	Nombre	Efecto/ Plaga Objetivo
Primera	Inorgánicos	1000- 80 AC.	Azufre, arsénico	Insecticidas
		100 AC.	Elébro	Raticida e insecticida
		1800-1825	Cloruro de mercurio	Preservación madera
		1808-1867	Arseniato de cobre (Verde Paris)	Escarabajo de la papa
		1880	Sulfato cobre- cal (Caldo Bordelés)	Fungicida en vid
		1886	Cianuro de hidrógeno	Fumigante en cítricos
		1896	Sulfato de cobre	Herbicida
		1907	Arseniato de calcio	Insecticida
	Botánicos	1800-1850	Piretrina, Rotenona	Insecticida
		1690	Extracto de tabaco	Insecticida de contacto
			Caldo de tabaco	Insecticida
		2000	Azadiractina	Insecticida
		Aceites minerales	1300	Aceite mineral
Segunda	Orgánicos	1882	Naftalina	Preservación insectos
		1912	p-diclorobenceno	Palomilla de la ropa
		1927	Cloruro de etileno	Fumigante
		1929	Tiocinato	Insecticida de contacto
		1936	Pentaclorofenol	Preservación madera
	Organoclorados	1939-1945	DDT, clordano	Insecticida
	Organofosforados	1946	TEPP , paratión	Insecticida
	Carbamatos	1943	Zineb	fungicida
		1955	aldicarb, carbofurán	Insecticidas
	Triazinas	1958	Atrazina	herbicida
	Bipiridilos	1958	Paraquat	herbicida
	Clorofenoles	1963	Clortalonil	Fungicida
	Piretroides	1973	Permetrina	Insecticida
Tercera	Microbianos	1960	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecticida
		1991	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Insecticida
Cuarta	IGR *	1975	Metoxipreno	Insecticida
Quinta	Abamenctinas	1980	Abamectina/ ivermectina	Insecticida
	Neonicotinoides	1990-2000	Imidacloprid, spinosad	Insecticida

* IGR= reguladores del crecimiento de insectos. (Fuente: Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994, Ware 1994, Mendoza 2002).

A finales de la década de 1950 se introdujeron en el mercado tanto insecticidas como fungicidas y herbicidas del grupo de los carbamatos (CARB), con acción insecticida no sistémica (por ejemplo, carbaril), los sistémicos altamente tóxicos (como el aldicarb), y ditiocarbamatos con acción antifúngica (zineb, maneb). El clorotalonil, perteneciente al grupo de los clorofenilos fue introducido después de 1960, siendo el fungicida de mayor uso en hortalizas y ornamentales, al igual que los herbicidas del grupo de los bipiridilos, atrazina (triazinas) y paraquat (Hewitt 1998, Mendoza 2002). En la década de 1970 surgieron los piretroides (PYR) como la aletrina, permetrina, cipermetrina y deltametrina, los cuáles son menos tóxicos a mamíferos, (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez 1994, Hewitt 1998, Ware 1994, Casadei 2003, Bohmont 2007).

Tras casi 40 años de combate químico de plagas y por los daños a la salud y al ambiente, los OC con excepción de endosulfan y dicofol, fueron prohibidos y restringidos en 1973, iniciando así el aumento en el uso de plaguicidas de la tercera generación, los compuestos microbianos o biológicos. Como por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* quien posee una toxina contra larvas de lepidópteros plaga, otro ejemplo es la toxina producida por el hongo *Metarhizium anisopliae* que al entrar por aberturas naturales de insectos es letal. Los *Baculovirus* atacan larvas de lepidópteros plaga; son específicos y no tienen efectos al ambiente por ser de incidencia natural, también se han usado formulaciones de bacterias como *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces griseovirides* y hongos en formulaciones de polvo como *Trichoderma harzianum* para el control de hongos patógenos (Hewitt 1998, Casadei 2003, Rossel *et al.* 2008).

Los compuestos de la cuarta generación de plaguicidas se desarrollaron desde la década de 1970, pero su uso se extendió más tarde (1990), estos compuestos comprenden los productos que tienen acción sobre procesos fisiológicos de insectos, como los reguladores del crecimiento o IGR por sus siglas en inglés (Casadei 2003, Carlile 2006).

En la década de 1980 se desarrollaron los plaguicidas de la quinta generación, como la abamectina, una lactona macrocíclica derivada de *Streptomyces avermectilis* con acción insecticida. Hacia 1990 surgieron los insecticidas imidacloprid, tiacloprid y spinosad, esta última obtenida de la fermentación del hongo *Saccharopolyspora spinosa*, los cuáles son sustancias semejantes a la nicotina (Casadei 2003, Carlile 2006), el compuesto botánico derivado de las semillas de Neem (*Azadirachta indica*) planta de la cual toma su nombre, azadiractina, que tiene acción sobre un amplio espectro de insectos actuando como disruptor en la alimentación y crecimiento, es altamente biodegradable y con muy poca toxicidad en humanos (Ware 1994, Koul 1999, Blanco y Bernal 2003).

2.4 CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas pueden ser clasificados según el tipo de organismos que controla, su uso, persistencia, toxicidad, origen, grupo químico o modo de acción entre otros (WHO 1990, Ramírez y Lacasaña 2001, Arias-Estévez *et al.* 2008).

2.4.1 Clasificación plaguicidas según los organismos que controla y uso al que se destinan

Dependiendo del tipo de organismos que el plaguicida elimina, controla, repele o inhibe, el producto toma un nombre más específico, por ejemplo los que controlan insectos (insecticidas), hongos (fungicidas), malezas (herbicidas), roedores (rodenticidas), etc. (Ware 1994, Arias-Estévez *et al.* 2008). Según su uso, se les clasifica como plaguicidas agrícolas cuando son usados para controlar plagas en cultivos y producción de flores; son plaguicidas forestales cuando se destinan para el control de plagas en bosques; y plaguicidas veterinarios cuando son usados contra plagas de ganado incluyendo mascotas (Ware 1994, IPCS 2002). Los plaguicidas urbanos se emplean para el control de plagas de áreas verdes, estructuras de edificios y en los hogares

para controlar pulgas, chinches de cama, cucarachas, etc. De igual forma, se usan plaguicidas para la salud pública contra vectores de enfermedades y la erradicación de cultivos cuyo fin sea la fabricación de estupefacientes y drogas ilícitas (Ware 1994, López *et al.* 1998, Ramírez y Lacasaña 2001, Arias-Estévez *et al.* 2008).

2.4.2 Clasificación de plaguicidas por su persistencia en el ambiente y toxicidad

La persistencia de los plaguicidas se define por su capacidad para conservar su integridad molecular, química, física y funcional una vez que se liberó al ambiente; muchos compuestos persisten por largos periodos en el suelo, subsuelo, cuerpos de agua y sedimentos. Dicha persistencia varía de acuerdo a la dosis, formulación, condiciones ambientales y tipo de suelo. La persistencia de un plaguicida se expresa según la vida media del compuesto en no persistente, moderadamente persistente, persistente y permanente (Cuadro 2.2) (WHO 1990, Bejarano 2002, Navarro *et al.* 2007)

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) define la toxicidad de plaguicidas como la capacidad de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período relativamente corto. También establece la clasificación de plaguicidas basada en la peligrosidad o grado de toxicidad aguda, ésta se expresa a través de la dosis letal media (DL₅₀) o concentración letal media (CL₅₀), ambos parámetros varían conforme a la presentación del producto (sólido, líquido, gas o polvo), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad, y el sexo (Cuadro 2.3) (WHO 1990, CICOPLAFEST 2004).

Dentro de los plaguicidas extremadamente peligrosos (Ia) están varios OP's como el forato, entre los altamente peligrosos (Ib) están monocrotofós, profenofós (OP), carbofurán (CARB) y cipermetrina (PYR). En el grupo de los moderadamente peligrosos (II) están dimetoato,

cloroirifós, quinalfós y fentión (OP); endosulfán (OC), cialotrina (PYR), y carbaril (CARB) y como ligeramente peligrosos (III) el insecticida malatión (OP) y deltametrina (PYR) (WHO 2009).

Cuadro 2.2 Clasificación de plaguicidas según la vida media

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	0 días a 12 semanas	malatión, carbaril
Moderadamente persistente	1 a 18 meses	paratión, lanate
Persistente	1 a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanente	Indefinidamente	plaguicidas a base de mercurio, plomo y arsénico

(Fuente: Ramírez y Lacasaña 2001).

Cuadro 2.3 Clasificación de plaguicidas según su toxicidad aguda

Clase	Vía Oral		Vía Dérmica	
	Sólido mg kg⁻¹	Líquido mg kg⁻¹	Sólido mg kg⁻¹	Líquido mg kg⁻¹
I a Extremadamente peligroso	≤5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
I b Altamente peligroso	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II Moderadamente peligroso	50 - 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III Ligeramente peligroso	≥ 500	≥ 2000	≥ 1000	≥ 4000

[Fuente: WHO 1990, International Program of Chemical Safety (IPCS) 2002]

2.4.3 Clasificación por su grupo químico y modo de acción

El grupo toxicológico o grupo químico de los plaguicidas define las características del compuesto, así como la persistencia, la polaridad, la bioacumulación y la efectividad de los mismos, también puede definir el modo o sitio de acción sobre los organismos.

El grupo de los organoclorados (OC) presentan átomos de cloro e hidrógeno, son no polares y altamente lipofílicos, con valores de presión de vapor bajos lo que los hace muy estables, residuales y altamente bioacumulables en la cadena trófica (DDT, lindano, endosulfán) (Bayona y Albaigés 2006). Los organofosforados (OP) se derivan del ácido fosfórico, presentan menos persistencia que los OC; sin embargo, son más tóxicos para los vertebrados; clorpirifós (insecticida), terbufós (nematicida) y triamifós (fungicida) pertenecen a éste grupo. Los carbamatos son más selectivos y muestran una persistencia media comparada con los OC y OP, tienen tres radicales, dos de ellos de cadena alifática corta (etil, metil) y la otra cadena alifática cíclica o heterocíclica; carbaril, carbofurán (insecticida), zineb, maneb (fungicida) y profam (herbicida) son representantes de este grupo. Los piretroides se derivan de los piretros naturales con adición o sustitución de grupos químicos en el enlace del alcohol haciéndolos más estables, que las moléculas naturales, son más específicos y muy poco tóxicos para mamíferos, básicamente tienen acción insecticida, cipermetrina y deltametrina son algunos representantes de este grupo (Ware 1994, Stenersen 2004, Bohmont 2007)

Los fungicidas tienen un gran número de grupos químicos, además de los carbamatos y organofosforados antes mencionados, están los fungicidas orgánicos de contacto derivados del benceno (pentaclorofenol), las sulfenamidas (captan, folpet), los dinitrofenoles (dinocap), las triazinas (anilazina); en el grupo de los clorofenoles está el clorotalonil, considerado como fungicida protector de follaje y de muy amplio espectro de acción (Ware 1994, Hewitt 1998, Mendoza 2002).

Algunos fungicidas sistémicos son las carboxiamidas (carboxin), las morfollinas (tridemorf), las piridinas y azoles (imidazoles y triazoles), y los bencimidazoles (benomil) (Ware 1994, Hewitt 1998, Mendoza 2002, Bohmont 2007).

Los herbicidas también comprenden un amplio número de grupos químicos, como los de contacto, las acetanilidas (alaclor, acetoclor), las amidas (propanil), las bipyridinas (diquat, paraquat), las nitroanilinas (trifluralin, pendimetalina), los imidazoles (imazapir), los derivados del ácido fenoxiacético (2-4-D). Algunos sistémicos como los fosfona aminoácidos (glifosato, glufosinato), las sulfonilureas (clorsulfurón) y las triazinas (triazina) (Ware 1994, Bohmont 2007).

Por su modo de acción y los sitios de acción, los insecticidas se dividen en aquellos que afectan el sistema nervioso (inhibidores de la acetilcolinesterasa y el ácido gamma- aminobutírico (GABA), los disruptores del crecimiento y metamorfosis (agonistas de la ecdisona y hormona juvenil), los citolíticos (endotoxinas *Bt*). Los fungicidas se dividen en disruptores de función de membrana (inhibidores de la síntesis del ergosterol, inhibidores de la respiración (inhibidores de la fosforilación oxidativa), disruptores de procesos nucleares (inhibidores de la síntesis de ADN y ARN), por mencionar algunos. En el caso de los herbicidas están los inhibidores del metabolismo (inhibidores del transporte de electrones en respiración) o los inhibidores de la fotosíntesis (Ware 1994, Hewitt 1998, Mendoza 2002, Casida y Quistad 2004, Stenersen 2004, Carlile 2006, Gisi y Sierotzki 2008).

2.5 DISPERSIÓN Y DEGRADACIÓN

Una vez que un plaguicida ha sido liberado al ambiente, el compuesto se dispersa y llega al aire, al suelo, al agua o la biota (seres vivos), denominados también compartimentos, y a través del tiempo el plaguicida pasa del compartimento inicial a los demás compartimentos (Figura 2.3). La dispersión puede ocurrir por deriva, volatilización, arrastre o escurrimiento por lluvia, lixiviación o bioacumulación principalmente, el tiempo y la forma de dispersión dependerán de

diversos factores y condiciones en cada compartimento (Linde 1994, Chaudhry *et al.* 2002, Seiber 2002, Hu *et al.* 2009).

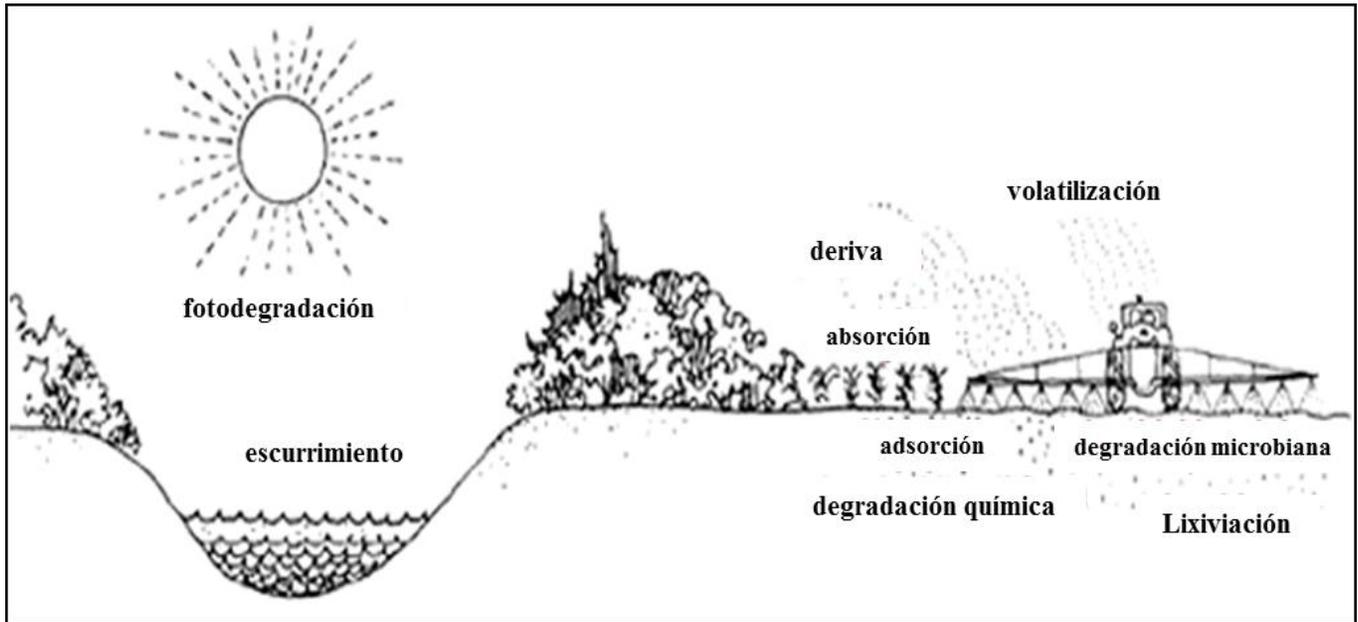


Figura 2.3 Dispersión y degradación de plaguicidas en el ambiente. (Fuente: <http://pesticidestewardship.org/water/Pages/FateofPesticides.aspx>. Mayo 2013)

La presencia de plaguicidas en el aire ocurre por volatilización, mediante aplicaciones aéreas o por deriva al realizar aplicaciones con equipos de alta presión (Carlile 2006, Gil *et al.* 2007, Navarro *et al.* 2007). El depósito de plaguicidas en el suelo ocurre al realizar tratamientos directos al suelo para el control de plagas y malezas, por los residuos que caen durante la aplicación foliar y por lluvia que arrastra los plaguicidas que se encuentran en la atmósfera y las plantas tratadas (López-Pérez *et al.* 2006, Gil *et al.* 2007, Navarro *et al.* 2007, Querejeta *et al.* 2012). En general, el suelo es el compartimento más expuesto al depósito de plaguicidas y en él se presenta una dinámica compleja de procesos físicos, químicos y biológicos que controlan su permanencia, biodegradación o movilidad a otros compartimentos (Kerle *et al.* 2007, Arias-Estévez *et al.* 2008). Además la dispersión y degradación de plaguicidas es dependiente de la

estructura química del plaguicida, las características fisicoquímicas y el manejo cultural del suelo (Singh *et al.* 2005, Navarro *et al.* 2007, Alletto *et al.* 2010).

La entrada de plaguicidas en aguas superficiales, ríos, lagos y al mar ocurre por volatilización, condensación de niebla, por nieve, por la deriva de las aplicaciones aéreas, por arrastre directo de los campos cercanos a los cuerpos de agua y por lluvia; en aguas profundas y mantos freáticos, la deposición de plaguicidas se da básicamente por lixiviación (Tanabe *et al.* 1994, Arias-Estévez *et al.* 2008; Kumari *et al.* 2008).

Los plaguicidas se incorporan a la biota por medio de la aplicación directa al organismo (dérmica o integumentaria), por vía respiratoria, o por ingestión de alimentos u otros organismos contaminados con el plaguicida, y pueden bioacumularse en los seres vivos a todo lo largo de la cadena trófica, ya sea por acumulación pasiva o activa, e incluso biomagnificarse y bioconcentrarse en los tejidos de los organismos, tal es el caso de los OC por su alta afinada lipofílica (Linde 1994, Carlile 2006, Vassilev y Kambourova 2006, Müller *et al.* 2007, Hu *et al.* 2009).

Tras la liberación y dispersión de un plaguicida en el ambiente, éste se degrada mediante procesos químicos (factores abióticos) y por procesos biológicos (factores bióticos) (Müller *et al.* 2007, Hu *et al.* 2009). En general, los metabolitos resultantes de la degradación de un compuesto en el ambiente son menos persistentes y tóxicos que la molécula parental; sin embargo, la transformación de algunos plaguicidas como ciertos carbamatos, triazinas, organofosforados y algunas sulfonilureas, resultan más tóxicos que el compuesto original (Boxal *et al.* 2004). Entre los factores abióticos están procesos químicos como hidrólisis, oxidación-reducción, sustitución, eliminación, dehalogenación y fotodegradación (Mulbury y Kearny 1991, Müller *et al.* 2007). Todos los plaguicidas son susceptibles a la fotodegradación en cierto grado y ésta varía dependiendo las propiedades del plaguicida y el tiempo de exposición, incluso el compartimento

en el que se lleva a cabo la degradación (Kerle *et al.* 2007, Müller *et al.* 2007, Navarro *et al.* 2007, Daam y Van den Brink 2010).

Los procesos de degradación por factores bióticos pueden ocurrir por oxidación, hidroxilación, hidrólisis, dehalogenación, dealquilación o formación de conjugados en los que están involucrados microorganismos (Linde 1994, Atterby *et al.* 2002, Müller *et al.* 2007, Navarro *et al.* 2007). Los microorganismos son capaces de mineralizar plaguicidas completa o parcialmente, ya sea utilizándolos como fuente de carbono (biodegradación) o por cometabolismo en donde el plaguicida no es la fuente de carbono, pero la degradación ocurre por la acción de enzimas extracelulares (Kerle *et al.* 2007, Müller *et al.* 2007). Cabe mencionar que la actividad de los microorganismos está fuertemente influenciada por la temperatura, la humedad, el pH y los nutrientes del suelo, así como la población de microorganismos y la naturaleza química del plaguicida (Müller *et al.* 2007).

2.6 CONTAMINACIÓN Y DAÑOS A LA SALUD POR PLAGUICIDAS

Desde hace décadas se han empleado plaguicidas orgánicos altamente tóxicos y residuales, a la producción anual de estos compuestos, hay que agregar aquellos plaguicidas obsoletos y prohibidos que no aparecen en las estadísticas anuales de consumo de plaguicidas y que son un riesgo potencial para la salud humana y el ambiente.

Se estiman unos 7 millones de toneladas de plaguicidas obsoletos en varios países de Europa, Japón, China, India, Brasil y EUA (Vijgen y Egenhofer 2009, Vijgen *et al.* 2011, Vijgen *et al.* 2012). En México, conforme a los acuerdos tomados en la Convención de Estocolmo de 2001 se implementó un inventario en el que estiman unos 26,725 litros y 147, 274.2 kg de plaguicidas obsoletos distribuidos en 29 estados de la República (Romero-Torres 2008).

2.6.1 Contaminación por plaguicidas

La contaminación de compuestos xenobióticos puede ser puntual o difusa. La contaminación puntual es aquella en la que se conoce la fuente de contaminación o el punto en donde se origina, por ejemplo, los desechos industriales, urbanos o pecuarios, la contaminación difusa o no puntual es aquella en la que no se conoce la fuente o las fuentes de la contaminación ni sus orígenes. La contaminación puntual es más susceptible de controlar o remediar que la difusa (Carpenter *et al.* 1998, Almeida *et al.* 2012, García *et al.* 2013)

En el caso de los plaguicidas, las actividades agropecuarias se consideran como una fuente principal de contaminación difusa (Carpenter *et al.* 1998, Campagna *et al.* 2006, Bortoluzzi *et al.* 2007), sin embargo, durante la preparación de las mezclas de productos a aplicar, el lavado de los equipos de aplicación y las descargas de agua contaminada con plaguicidas en las empacadoras de vegetales son un origen puntual de contaminación importante (Torstensson 2000).

La dispersión y persistencia de los plaguicidas los ha hecho llegar hasta zonas remotas provocando la contaminación del ambiente (contaminación difusa), afectando fauna benéfica y consumidores de alimentos y agua contaminados, derivando en la bioacumulación en todos los niveles de las cadenas tróficas (Atterby *et al.* 2002, Chaudhry *et al.* 2002, Chaudhry *et al.* 2005, Chopra *et al.* 2011). Se han encontrado plaguicidas incluso en regiones donde no realizan aplicaciones como en el Ártico (Ballschmitter *et al.* 2002, Li y Macdonald 2005, Vassilev y Kambourova 2006, Wang *et al.* 2010, Chopra *et al.* 2011).

Aunque los plaguicidas OC fueron prohibidos desde la década de 1970, continúan siendo una importante fuente de contaminación en todos los ambientes. Así, se han encontrado altas concentraciones de OC en el mar, en especial el DDT y sus metabolitos. En la figura 2.4, se observa la distribución de DDT en el mar, mostrando las mayores concentraciones en la zona costera del mar Índico (Bayona y Albaigés 2006).

Susuki *et al.* (2003) encontraron la presencia de simetrin, iprobenfós y otros plaguicidas OP en agua pluvial en Japón. En India, Kumari *et al.* (2008) analizaron la presencia de plaguicidas en suelo y agua, y encontraron HCH, DDT, endosulfán, clorpirifós y otros OP que rebasaron los límites permitidos en agua potable. Rand *et al.* (2010) encontraron altas concentraciones de endosulfán en ecosistemas acuáticos en Florida, y observaron que este insecticida causa mortalidad de los peces. En Canadá, Xing *et al.* (2012) encontraron clorotalonil, atrazina, endosulfán y otros plaguicidas en cuencas y en la región marina, muchos de ellos excedieron las concentraciones permitidas para la calidad del agua en ese país.

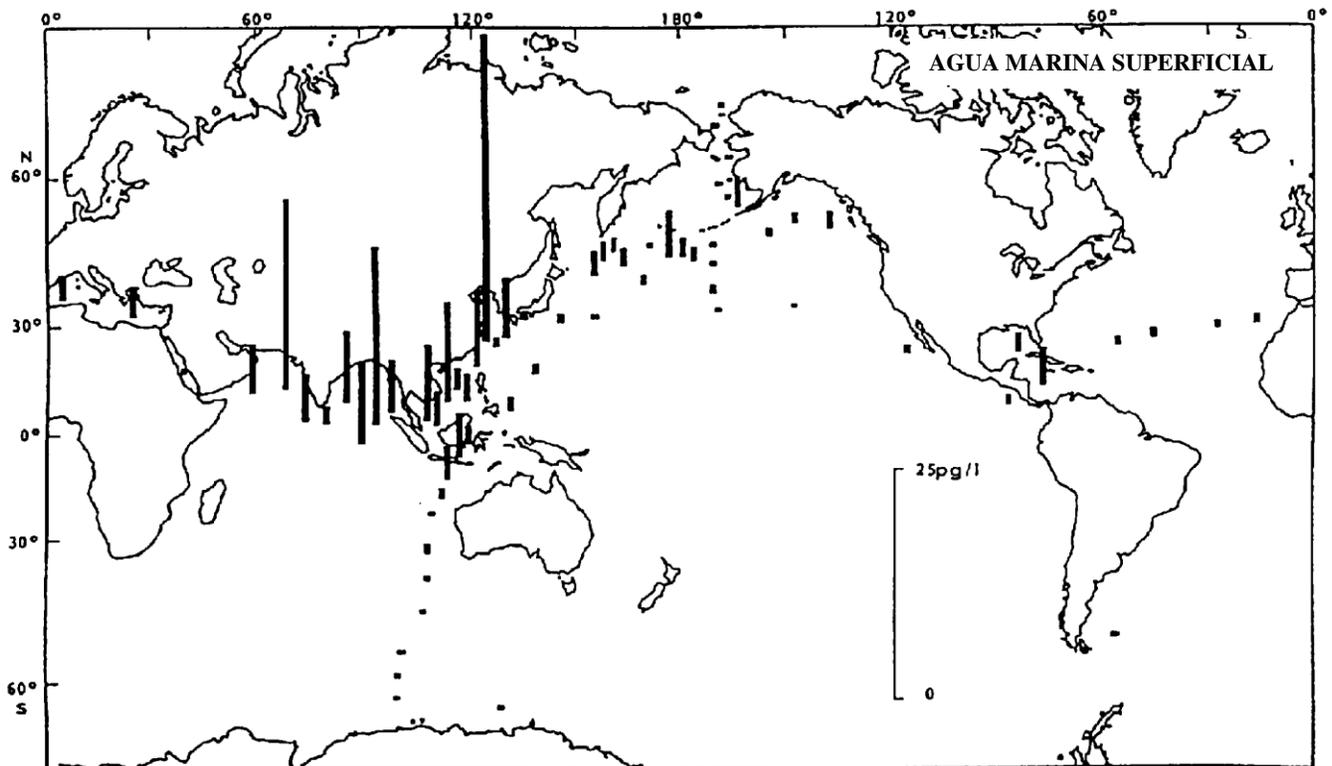


Figura 2.4. Distribución total de DDT en aguas marinas superficiales. (Tomado y modificado de Bayona y Albaigés 2006, Copyright 1993. American Chemical Society)

En México, Hernández-Antonio y Hansen (2011) encontraron atrazina y DDT en agua para consumo humano de Guasave, Sinaloa. Por su parte, García de la Parra *et al.* (2012) observaron

altas concentraciones de OC, OF y bifenilos policlorados (PCB) además de otros 32 compuestos en el sedimento de aguas del sistema de canales del Valle de Culiacán, Sinaloa; varios plaguicidas, entre ellos endosulfán rebasaron los límites permisibles en agua. Alegria *et al.* (2008) estudiaron el contenido de plaguicidas en el aire de las ciudades de Tapachula, Chiapas, en el Puerto de Veracruz y una zona rural de Tabasco (granja pesquera), y encontraron PCB, DDT, endosulfán, clordano y lindano, además indicaron que tanto DDT y clordano fueron recientemente usados en las zonas de estudio.

2.6.2 Exposición, ingesta, bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas

Los plaguicidas están presentes en agua potable, tejidos de animales de vida silvestre y vegetación en general, pero sobretodo en productos agropecuarios que forman parte de nuestra dieta diaria. Altas concentraciones de PCB, DDT y HCH se encontraron en músculos, hígado y riñones de aves en China, en plumas de aves migratorias en Irán y ocasionaron un aumento de mortalidad en ranas arborícolas por endosulfán en Australia (Broomhall y Shine 2003, Behrooz *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2011). Además se ha reportado la presencia de plaguicidas OC en leche cruda de bovino, huevo, carne y pescado (Dhananjayan y Muralidharan 2010, Kaushik *et al.* 2011, Selvi *et al.* 2012). En México, también se encuentran plaguicidas como DDT y HCH acumulados en el tejido de peces (Tilapias) en Meztitlán, Hidalgo, rebasando los límites permitidos por las normas del país (Fernández-Bringas *et al.* 2008); incluso se han encontrado tanto moléculas parentales como metabolitos de HCH, heptaclor, endosulfán, aldrin, endrin y dieldrin en agua embotellada en la Ciudad de México (Díaz *et al.* 2009).

La ingesta diaria y el contacto con plaguicidas han propiciado la presencia de plaguicidas persistentes en el humano, encontrando así, metabolitos de DDT, HCH y 20 moléculas de la familia de los PBC en leche materna de madres que consumen productos con residuos de estos

contaminantes en Túnez (Ennaceur y Rhida Driss 2012). La población de Veracruz, México, ha mostrado la presencia de DDT, HCH y otros plaguicidas OC en sangre y tejido adiposo abdominal (Herrero-Mercado *et al.* 2010, Waliszewski *et al.* 2012).

2.6.3 Daños a la salud por plaguicidas

Una de las mayores preocupaciones de la dispersión y acumulación de los plaguicidas en el ambiente son los daños a la salud humana, debido a su presencia en alimentos, animales, casas, aire, suelo y agua (WHO 1990). Los plaguicidas pueden entrar en nuestro organismo por inhalación, ingestión o contacto y sus efectos pueden ir desde una intoxicación aguda o crónica, irritación de ojos y salivación excesiva hasta enfermedades como el cáncer (Kesavachandran *et al.* 2008).

Los padecimientos y enfermedades que se asocian a la exposición crónica de plaguicidas pueden ser neurológicos, respiratorios, dérmicos, oculares, endocrinológicos y reproductivos. Los plaguicidas pueden acumularse en el cerebro y dañarlo; además afectan el sistema nervioso periférico ya que es el sitio de acción de varios plaguicidas (OC, OP y CARB) al provocar la degeneración de la mielina, y la inhibición de la enzima colinesterasa, incrementando con ello el riesgo de enfermedades neurodegenerativas como el mal de Parkinson (WHO, 1990, Kesavachandran *et al.*, 2008).

Los plaguicidas afectan también el sistema respiratorio, y pueden inducir el padecimiento de asma; en la piel provoca dermatitis y alergias por el contacto; a nivel ocular causa irritaciones y atrofia del nervio óptico; además pueden provocar desorden hormonal, inmunodepresión e inteligencia disminuida. En el sistema reproductivo provocan inmadurez sexual, desórdenes en las hormonas sexuales, abortos, muerte de recién nacidos y teratogénesis, aumenta el riesgo de

desarrollar cáncer de estómago, cerebro y piel. Entre otros padecimientos reportados están el daño al hígado, reducción de hemoglobina, y desórdenes musculo esqueléticos (Safe 2000, Gupta 2004, Bassil *et al.* 2007, Dasgupta *et al.* 2007, Kesavachandran *et al.* 2008, Van Maele-Fabry *et al.* 2010).

2.7 ENDOSULFÁN, CLORPIRIFÓS, CLOROTALONIL

2.7.1 Endosulfán

El endosulfán (6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodixatiopen-3-oxido) está compuesto por dos estereoisómeros, el α -endosulfán y β -endosulfán (Figura 2.5) en proporciones 70:30 respectivamente y está catalogado en la clase II, como moderadamente peligroso (WHO 2009). La solubilidad del endosulfán incrementa cuando el pH es bajo, la presión de vapor es de 1.7×10^{-7} mm Hg a 20° C (Cuadro 2.4). El Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH por sus siglas en inglés) recomienda una concentración máxima de 0.1 mg m³ en agua mientras que la EPA recomienda una concentración máxima de 74 $\mu\text{g L}^{-1}$ de endosulfán en ríos, lagos y corrientes; en aguas dulces no debe exceder 0.22 $\mu\text{g L}^{-1}$ y en el mar no más de 0.0087 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por su parte, México permite 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ en estuarios y 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ en aguas costeras (Greene y Pohanish 2005). Las rutas de entrada en el hombre ocurren por inhalación, ingestión, por absorción en la piel y ojos, es secretado rápidamente por excretas y la orina (Stahuljak y Valic 1984). El endosulfán presenta alta toxicidad en peces, es de moderada a altamente tóxico en aves y moderadamente tóxico a abejas, presenta mediana persistencia en el ambiente. Sin embargo, sus metabolitos como el endosulfán sulfato, lo convierten en un producto persistente y con alto potencial de bioacumulación (Rao y Murty 1980, Sutherland *et al.* 2002, Sethunathan *et al.* 2004). El endosulfán es un insecticida OC que actúa por contacto e ingestión sobre una amplia variedad de plagas de importancia agrícola

como gusano bellotero, escarabajos, chinches, áfidos, ácaros, pero también es usado para preservar madera, y para el control de insectos y ácaros en té, café frutales, hortalizas, arroz, cereales, maíz, sorgo y otros granos (Greene y Pohanish 2005).

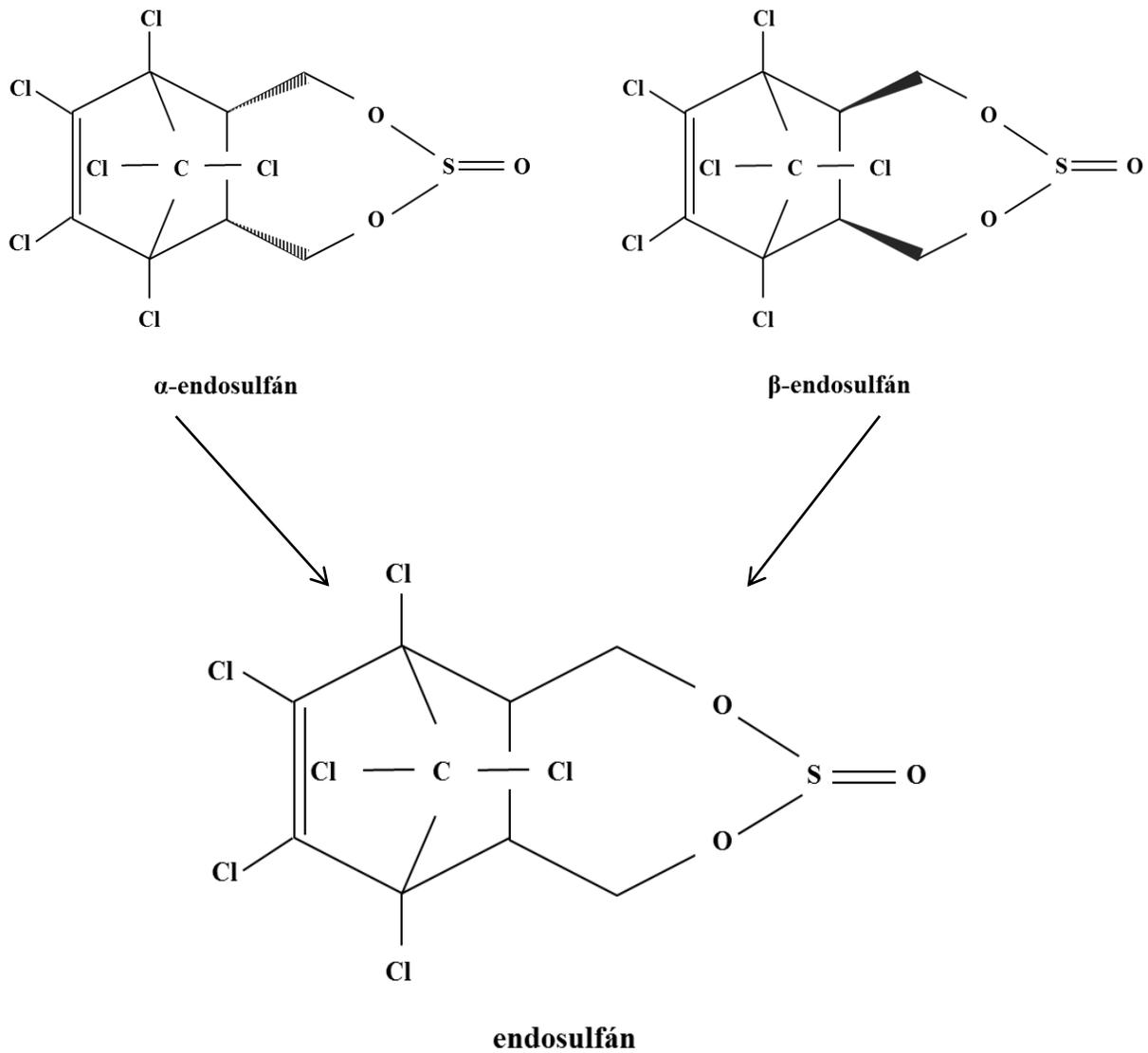


Figura 2.5. Composición química del endosulfán y sus isómeros. (Fuente: Kumar y Philip 2006).

Cuadro 2.4 Propiedades físicas y químicas de endosulfán, clorpirifós y clorotalonil.

PROPIEDAD	ENDOSULFÁN	CLORPIRIFÓS	CLOROTALONIL
Pureza	> 99% endosulfan	99.5%	99.7%
Peso molecular	406.96 g mol ⁻¹	350.6 g mol ⁻¹	265.91 g mol ⁻¹
Punto de fusión	83.3° C	42 a 43.5° C	252.1° C
Punto de ebullición	290- 350° C	Se descompone antes de la ebullición	350° C
Presión de vapor	1.7 x 10 ⁻⁷ mm Hg a 20° C	1.87 x 10 ⁻⁵ mm Hg a 25° C	1 x 10 ⁻³ mm Hg a 20° C
Constante de Henry	α-endosulfán: 1.48 Pa m ³ mol ⁻¹ β-endosulfán: 0.07 Pa m ³ mol ⁻¹ a 24° C	4.2 x 10 ⁻⁶ atm·m ³ mol ⁻¹ a 25° C	2.5 x 10 ⁻² Pa m ³ mol ⁻¹ a 25° C
Estado físico	sólido	solido	solido
Color	incoloro (cristalino)	Incoloro (cristalino)	Blanco (cristalino)
Olor	inodoro	mercaptano suave (azufrado)	olor ligero a humedad
Solubilidad en agua	α-endosulfán: 0.33 mg L ⁻¹ β-endosulfán: 0.32 mg L ⁻¹ a pH 5 y 22° C	0.4 mg L ⁻¹	0.6 mg L ⁻¹
Solubilidad en solventes orgánicos	n-hexano (0.24 g L ⁻¹)	Acetona Benceno Cloroformo	acetona (20.9 g L ⁻¹) etil acetato (13.8 g L ⁻¹) n-heptano (0.2 g L ⁻¹) xileno (74.4 g L ⁻¹) a 25° C
Persistencia	3- 9 meses y hasta 6 años	7 a 120 días y hasta 4 años	1 a 2 meses y hasta 1 año
Toxicidad	Moderadamente peligroso Clase II	Moderadamente peligroso Clase II	No ofrece peligro Clase IV

(Fuente: Stahuljak y Valic 1984, Racke 1993, Greene y Pohanish 2005, Christensen *et al.* 2009, FAO 2011, Gebremarian *et al.* 2012)

Los dos isómeros de endosulfán (Figura 2.5) son resistentes a la fotodegradación; sin embargo, los metabolitos como endosulfan-sulfato y endosulfan-diol son susceptibles a la fotólisis. Este insecticida se degrada en poco tiempo, pero en condiciones anaerobias y con pH bajo la vida media se prolonga; los metabolitos principales en agua son el endosulfán-diol y en menor cantidad a endosulfán-sulfato. En suelo, el isómero α -endosulfan se degrada más rápidamente que el β -endosulfán, y el metabolito principal es endosulfán-sulfato y en menor grado a endosulfán-diol y endosulfán-lactona, estos compuestos no son propensos a la lixiviación (Stahuljak y Valic 1984). El endosulfán también puede ser degradado por hidrólisis natural o inducida y por ozonización (Enjarlis y Ratnawati 2011).

La degradación biótica del endosulfán es posible mediante microorganismos del suelo, principalmente bacterias, hongos y algunas algas. En el Cuadro 2.5 se enlistan estudios de microorganismos capaces de degradar este insecticida. Los hongos transforman el endosulfán principalmente a endosulfán-sulfato mientras que las bacterias lo degradan a endosulfán-diol, los microorganismos del suelo pueden transformar los isómeros de endosulfán de alfa a beta y viceversa, pero con mayor frecuencia de beta a alfa al estar en medio líquido. En medio líquido, los microorganismos degradan el endosulfán principalmente a endosulfán-diol, luego a endosulfán-éter, endosulfán-hidroxiéter y finalmente endosulfán-lactona (Figura 2.6) (Kullman y Matsumura 1996), en suelos orgánicos, los microorganismos degradan principalmente a endosulfán-sulfato (Miles y Moy 1979).

Cuadro 2.5 Estudios de biodegradación de endosulfán con microorganismos.

Microorganismos	Referencia
<i>Bacillus</i> sp	Awasthi <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas spinosa</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Hussain <i>et al.</i> 2007a
<i>Ochrobacterum</i> sp, <i>Arthrobacter</i> sp, <i>Burkholderia</i> sp	Kumar <i>et al.</i> 2008
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kwon <i>et al.</i> 2005
<i>Pseudomonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Rhizobium</i>	Shaffiani y Malik 2003
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Singh y Singh 2011
<i>Chlorococcum</i> sp, <i>Scenedesmus</i> sp	Sethunathan <i>et al.</i> 2004
<i>Aspergillus niger</i>	Bhalerao y Puranik 2007
<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Auricularia fuscusuccinea</i>	Escobar <i>et al.</i> 2002
<i>Apergillus sydoni</i>	Goswami <i>et al.</i> 2009
<i>Chaetosartorya stromatoides</i> , <i>A. terrícola</i> , <i>A. terreus</i>	Hussain <i>et al.</i> 2007b
<i>Trametes hirsuta</i>	Kamei <i>et al.</i> 2011
<i>Phanerochaete chysosporium</i>	Kim <i>et al.</i> 2001
<i>A. terreus</i> , <i>Cladosporium oxysporum</i>	Mukherjee y Mittal 2005
<i>Fusarium ventricosum</i>	Siddique <i>et al.</i> 2003

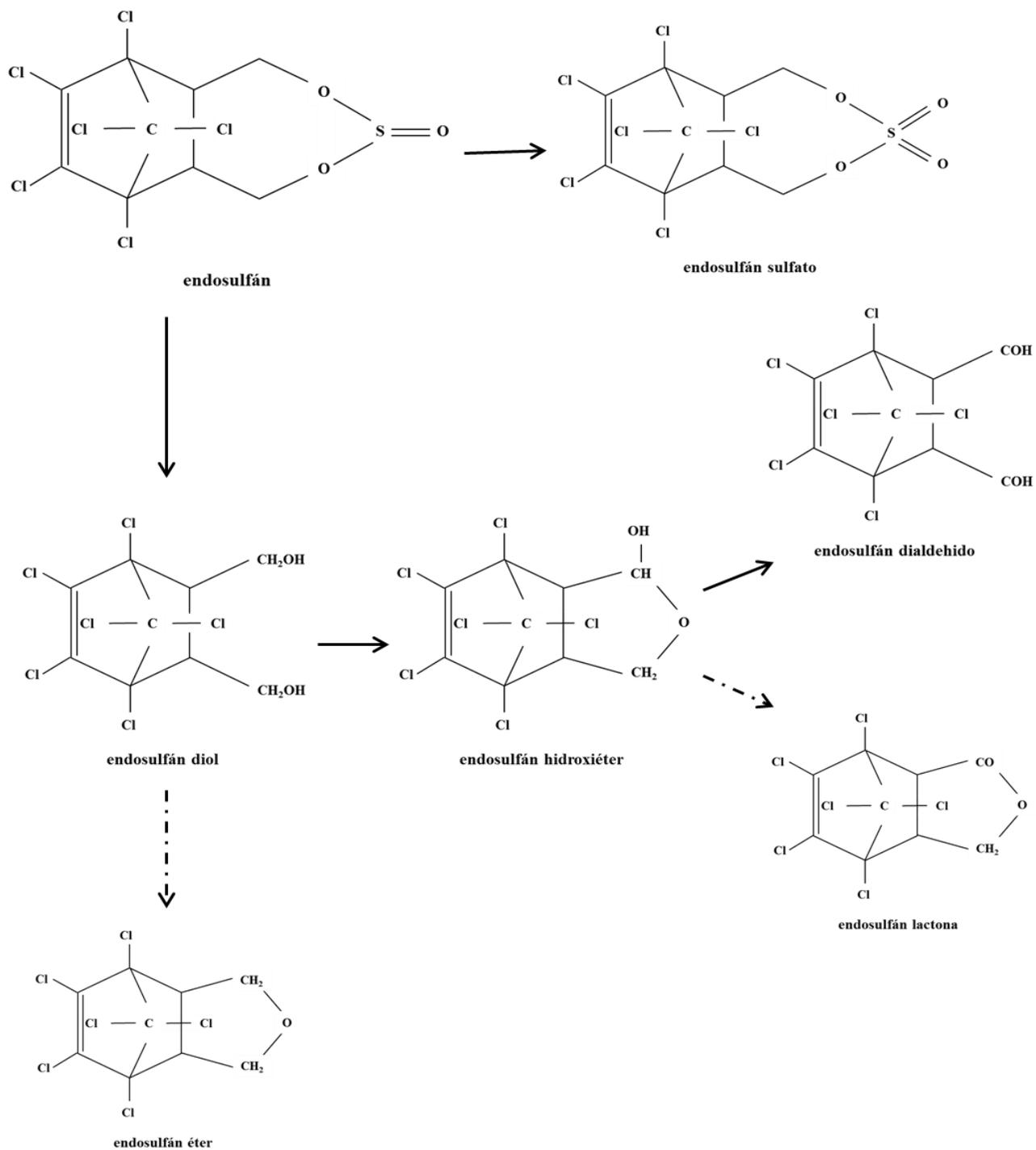
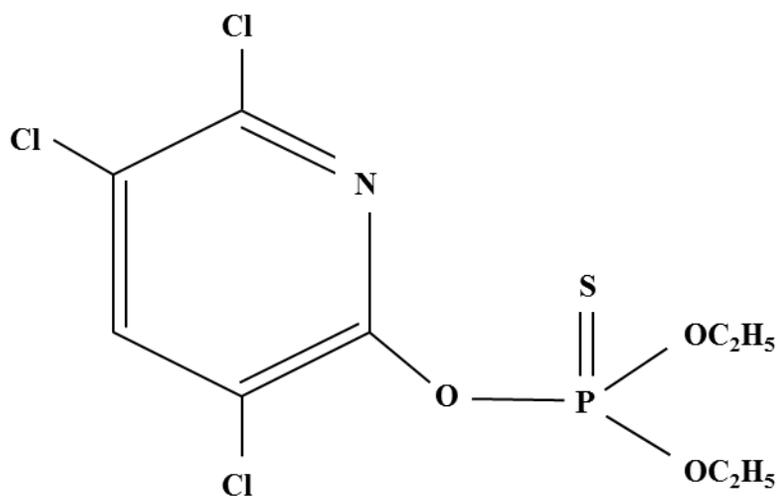


Figura 2.6. Posible ruta metabólica para endosulfán mediada por *P. chrysosporium* BU-1. Las flechas continuas indican las principales rutas metabólicas, las flechas punteadas indican las rutas metabólicas menores. (Fuente: Kullman y Matsumura 1996).

2.7.2 Clorpirifós

El clorpirifós [O, O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2 piridil) fosforotioato] (Figura 2.7), es un insecticida OF de contacto que está catalogado en la clase II, como moderadamente peligroso y se sospecha como disruptor endócrino (WHO 2009), tiene una presión de vapor de 1.87×10^{-5} mm Hg a 25°C , y punto de fusión de 40 a 43.35°C (Cuadro 2.4). El NIOSH recomienda una concentración máxima de 0.6 mg m^3 de clorpirifós en aire en un periodo no mayor a 8 h de exposición, mientras que la concentración máxima permitida en aguas costeras en México es de $3.0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ y en estuarios es de 0.03 mg L^{-1} (Greene y Pohanish 2005, Christensen *et al.* 2009). La toxicidad a largo plazo en hombres es intermedia ($20\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) y en peces es muy alta ($0.36\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$); en el hombre se absorbe por el tracto gastrointestinal, pulmones y por la piel, se distribuye rápidamente al torrente sanguíneo y se elimina con la orina, ya sea la molécula parental íntegra o sus metabolitos, es probable la bioacumulación en organismos marinos (Greene y Pohanish 2005)



clorpirifós

Figura 2.7 Estructura química del clorpirifós (Fuente: Mukherjee *et al.* 2004).

El clorpirifós es uno de los insecticidas OP más usados en la agricultura para el control de plagas en granos, algodónero, frutales, hortalizas y ornamentales; en el sector pecuario y veterinario se aplica en caballos, ovinos y perros, tiene varias restricciones en el sector urbano y se aplica en edificios y establecimientos comerciales. El clorpirifós actúa sobre el sistema nervioso de insectos como minadores, áfidos, larvas de insectos masticadores, cochinillas, barrenadores, cucarachas, termitas y hormigas (Greene y Pohanish 2005, Christensen *et al.* 2009).

Este plaguicida OP presenta persistencia moderada, con una vida media entre 60 días y hasta un año dependiendo del tipo de suelo, clima y otros factores (Pandey y Singh 2004). La degradación de clorpirifós puede ocurrir por rutas metabólicas aerobias o anaerobias y por factores abióticos como hidrólisis, fotólisis, y en menor grado por volatilización. Este insecticida tiene poca movilidad en el suelo pues se adsorbe fuertemente a las partículas. La volatilización desde el agua ocurre entre tres y 20 días, la fotólisis en el agua ocurre entre dos y tres semanas durante el verano (USEPA 1999); en el aire, la degradación ocurre por fotólisis en una reacción de radicales hidroxilo, formando clorpirifós-oxon (Aston 1997). Los residuos de clorpirifós permanecen en las plantas entre 10 y 14 días (Greene y Pohanish 2005), y sus metabolitos principales son 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), dietilfosfato y dietiltiofosfato (Figura 2.8) (Racke 1993). El metabolito TCP a diferencia de la molécula inicial (clorpirifós) no se adsorbe al suelo por lo que es altamente móvil y persiste hasta 120 días en este compartimento (USEPA 1999, Sardar y Kole 2005). La biodegradación biótica es posible por medio de microorganismos, los estudios de degradación de clorpirifós involucran principalmente bacterias, algunos hongos e incluso algas (Cuadro 2.6).

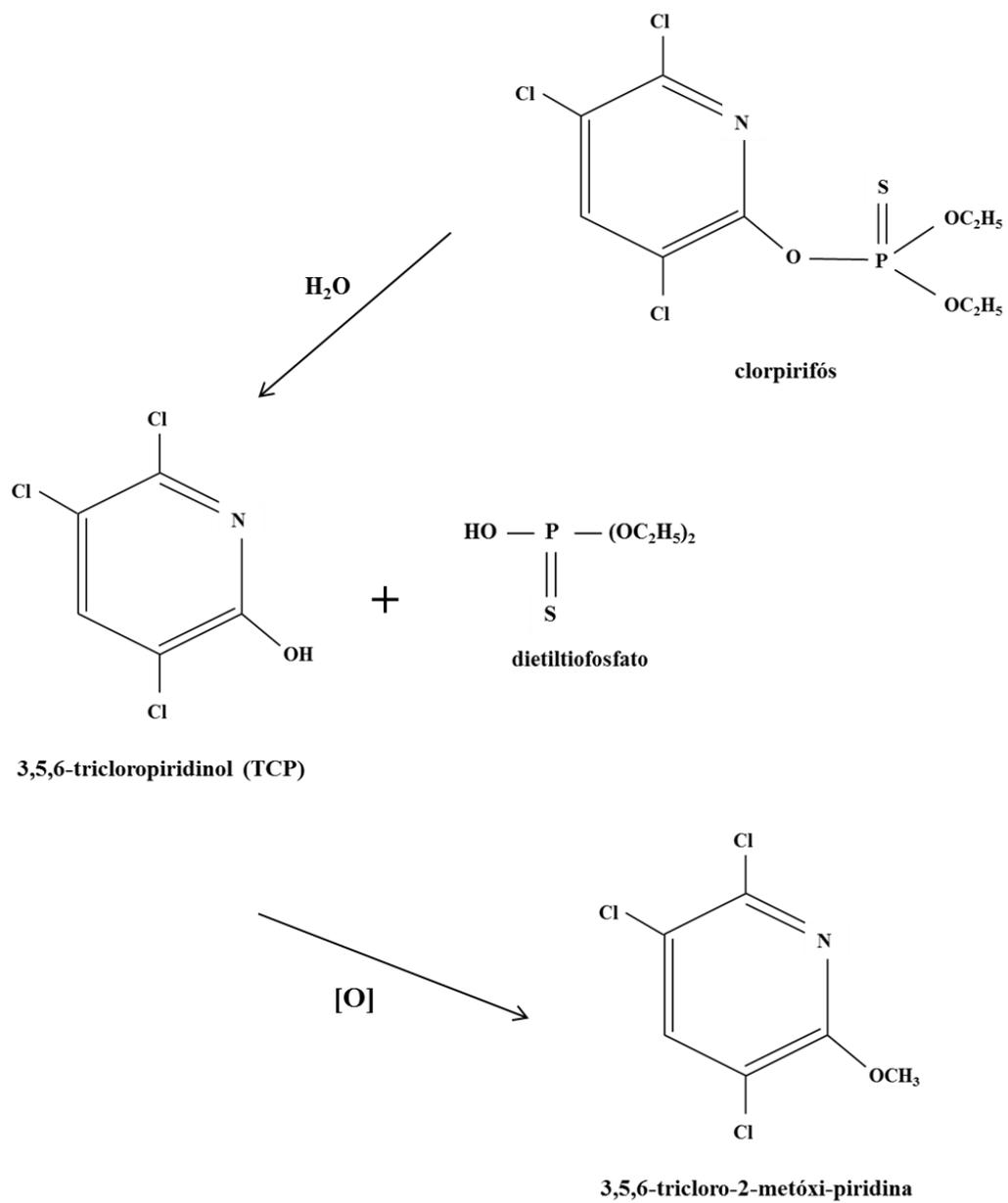


Figura 2.8 Transformación de clorpirifós en suelo. (Fuente: Sardar y Kole 2005).

Cuadro 2.6 Estudios de biodegradación de clorpirifós con microorganismos.

Microorganismos	Referencia
<i>Burkholderia</i>	Kim y Ahn 2009
<i>Streptomonas maltophila</i>	Kumari y Fulekar 2012
<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Klebsiella</i> <i>Serratia marcencens</i>	Laksmi <i>et al.</i> 2008
<i>Sphingomonas</i> sp, <i>Bacillus</i> sp, <i>Stenotrophomonas</i> <i>Arthrobacter</i> , <i>Flavobacterium</i>	Li <i>et al.</i> 2008 Mallick <i>et al.</i> 1999
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>P. aeuroginosa</i> , <i>Klebsiella</i> sp <i>Enterobacter</i> sp	Sasikala <i>et al.</i> 2012 Singh <i>et al.</i> 2006
<i>Verticillium</i> sp	Fang <i>et al.</i> 2008
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	Karas <i>et al.</i> 2011
<i>Acremonium</i>	Kulshrestha y Kumari 2010
<i>Aspergillus</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, <i>Eurotium</i> sp <i>Verticillium</i>	Maya <i>et al.</i> 2012 Yu <i>et al.</i> 2006
<i>Chlorella vulgaris</i>	Mukherjee <i>et al.</i> 2004

2.7.3 Clorotalonil

El clorotalonil (2,4,5,6,-tetracloro-1,3-benzenedicarbonitrilo) o también llamado tetracloroisofaltonitrilo (Figura 2.9) es un fungicida de contacto de amplio espectro, que está clasificado en el grupo 2B como posible carcinogénico según el IRAC (Insecticide Resistance Action Comitee) (Wang *et al.* 2011), tiene una presión de vapor de 1×10^{-3} mm Hg a 20° C y punto de fusión de 252.1° C (Cuadro 2.4). El clorotalonil se absorbe por inhalación y contacto con la piel (Greene y Pohanish 2005). La concentración permisible en aire es de 5 mg m^3 según la OSHA (Occupational Safety and Health Administration), y en agua es de 0.2 mg L^{-1} según la EPA. El clorotalonil no se bioacumula en organismos acuáticos y está catalogado como poco

tóxico en abejas, pájaros y mamíferos (Litchfield 1996). Además, tiene efecto no sistémico preventivo y pertenece al grupo de los clorofenilos para el control de antracnosis, septoriosis y tizones en diversos cultivos como plátano, cacahuete, papa, tabaco, frutales, ornamentales y en hortalizas como jitomate y cebolla (Litchfield 1996, Ukai *et al.* 2003, Greene y Pohanish 2005)

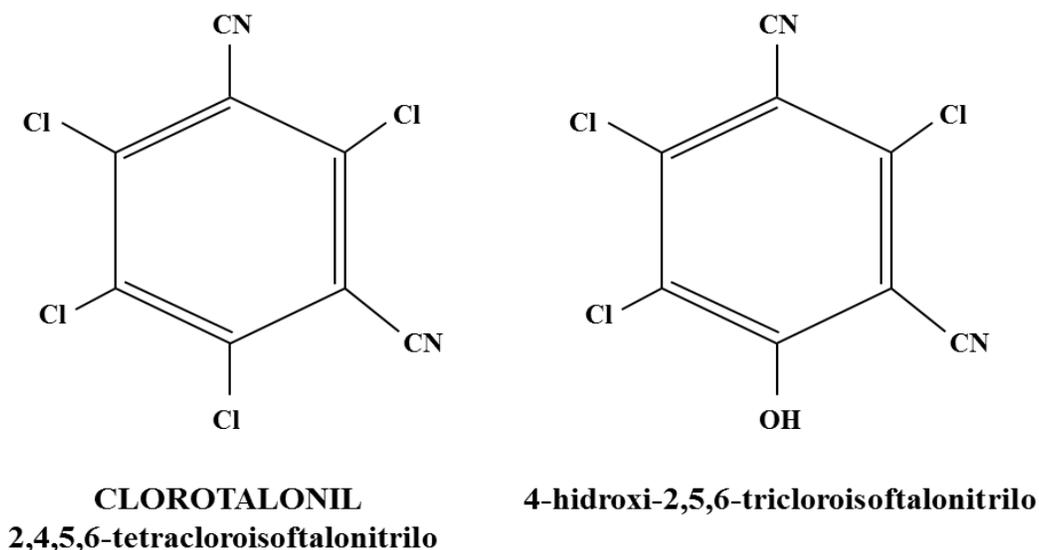


Figura 2.9. Estructura química del clorotalonil y su principal metabolito. (Fuente: Shi *et al.* 2001, Chaves *et al.* 2008).

El clorotalonil está catalogado como poco persistente; sin embargo, sus metabolitos son más persistentes y móviles que el compuesto parental (Greene y Pohanish 2005). La vida media de clorotalonil en suelo depende de las condiciones ambientales por lo que hay mucha variabilidad en los datos, pero se calcula que es de entre uno y dos meses e incluso hasta por un año (Motonaga 1996, Carlo-Rojas *et al.* 2004). Este fungicida se adsorbe fuertemente en la materia suspendida en el agua, el mayor metabolito de degradación es el 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisofalónitrilo aunque existen al menos 11 metabolitos identificados (Figura 2.10) (Litchfield 1996, Regitano *et al.* 2001, Chaves *et al.* 2008).

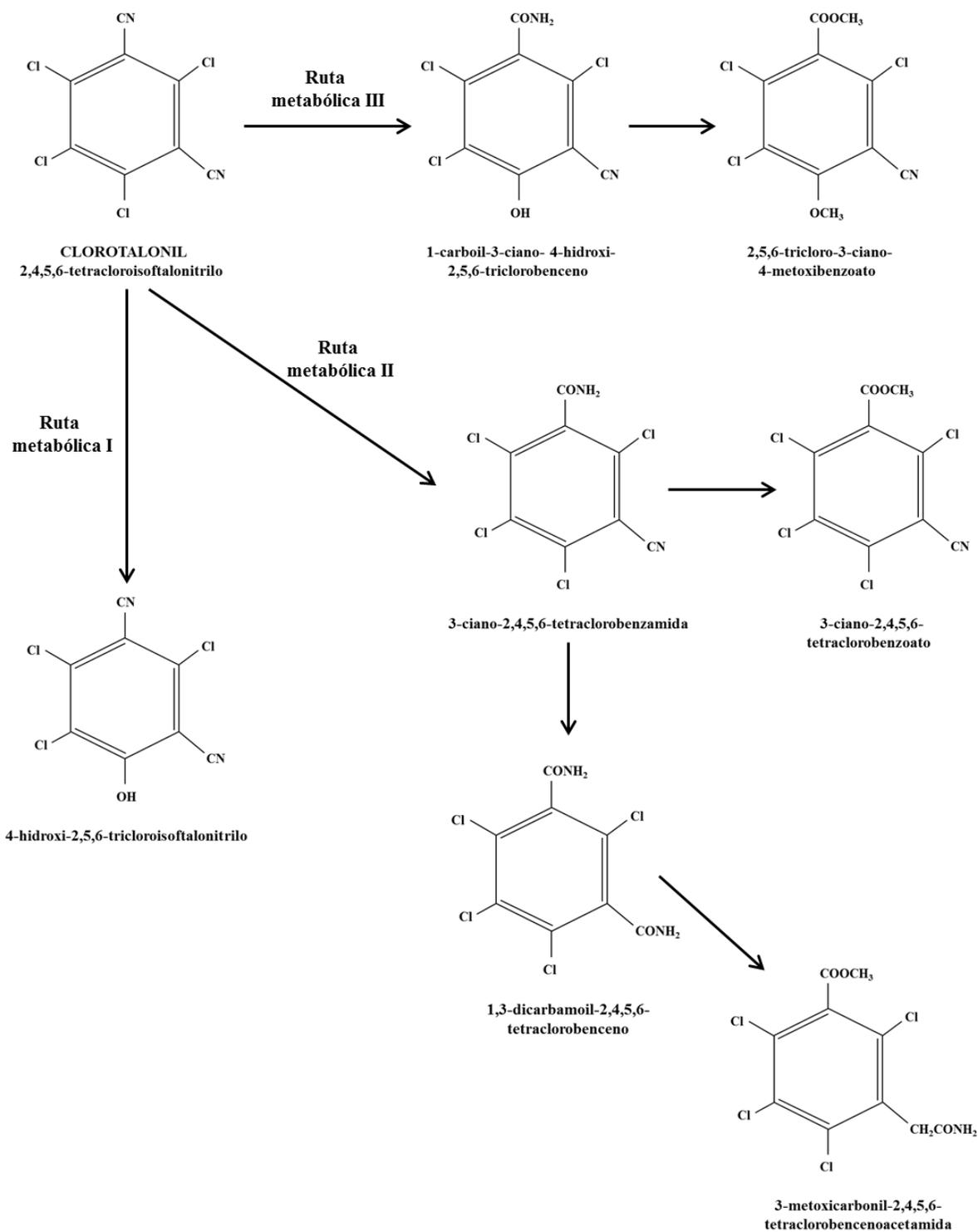


Figura 2.10. Ruta metabólica propuesta para la degradación de clorotalonil, mediada por *Ochrobactrum lupini* TP-D1 en medio medio mineral modificado y contaminado con 50 mg L⁻¹ del fungicida. La ruta metabólica I muestra la hidroxilación del grupo “cloro”. La ruta metabólica II muestra la hidratación del grupo “ciano”. La ruta metabólica III muestra la hidroxilación del grupo “cloro” e hidratación del grupo “ciano”. (Fuente: Shi *et al.* 2011.).

El clorotalonil no tiene acción sistémica por lo que no se trasloca a otro sitio de la aplicación en la planta y la degradación en ellas es limitada (Litchfield 1996). La degradación de clorotalonil por microorganismos como bacterias es posible (Cuadro 2.7), mediante la hidroxilación del grupo “cloro”, declorinación e hidrólisis del grupo “nitrilo” (Figura 2.10) (Ukai *et al.* 2003, Shi *et al.* 2011).

Cuadro 2.7 Estudios de biodegradación de clorotalonil con microorganismos.

Microorganismos	Referencia
<i>Ochrobactrum lupini</i>	Shi <i>et al.</i> 2011
<i>Shinella, Caulobacter, Rhizobium, Bordetella, Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus subtilis</i>	Wang <i>et al.</i> 2011
<i>Bacillus cereus</i>	Zhang <i>et al.</i> 2007

2.8 BIORREMEDIACIÓN

Debido a la continua liberación de plaguicidas para la producción agrícola, los malos manejos de disposición de los residuos y por ende, la severa contaminación de plaguicidas que prevalece en todos los ambientes, se han buscado métodos eficientes de degradación, ya sean abióticos (fotólisis u ozonificación) o bióticos (Burrows *et al.* 2002). Entre los bióticos está la aplicación de tecnologías como la biorremediación, que tienen el fin de degradar, inmovilizar o mineralizar compuestos xenobióticos en un ecosistema mediante el uso “controlado” de comunidades biológicas (Navarro *et al.* 2007, Singh 2008).

Los organismos más empleados para la biorremediación son plantas, algas, bacterias y hongos o la combinación de algunos de ellos (Atterby *et al.* 2002). Plantas como *Zea mays* L., *Sorghum vulgare* L., *Phaseolus vulgaris* L., *P. coccineus*, L., *Panicum maximun* Jacq. y *Triticum aestivum* L., se emplean con éxito en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo. Se ha

reportado que plantas de maíz, colza y café crecen en suelos contaminados con lindano, y que frijol y soya absorben y traslocan el lindano a las hojas. Entre las algas utilizadas en la biorremediación de aguas residuales están *Chlorella* y *Scenedesmus* y las cianobacterias filamentosas como *Fischerella* y *Spirulina*; en la degradación de plaguicidas se ha encontrado que cianobacterias del suelo como *Anabaena*, *Chlorococcum* sp, *Scenedesmus* sp, y *Chlorella vulgaris* pueden degradar endosulfán y clorpirifós (Chaudry *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003, Mukherjee *et al.* 2004, Sethunathan *et al.* 2004, Ferrera-Cerrato *et al.* 2006).

Para la degradación de diversos compuestos fenólicos como creosol, compuestos nitro aromáticos, hexaclorociclohexano (HCH), plaguicidas como DDT, endosulfán (OC), carbofurán (CARB) malatión, clorpirifós (OP), clorotalonil, 2, 4-D, alaclor, y atrazina, se ha probado la eficacia de degradación de varios géneros de bacterias como *Bacillus cereus*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Flavimonas oryzihabitans*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Vibrio*, *Klebsiella*, *Serratia marcescens*, *Rhizobium*, *Nocardioides* y *Pseudomonas* (Mulbury y Kearny 1991, Moorman 1994, Shafiani y Malik 2003, Satsuma *et al.* 2006, Singh *et al.* 2006, Tallur *et al.* 2006, Barragan-Huerta *et al.* 2007, Kulkarni y Chaudhari 2007, Chirnside *et al.* 2007, Rajashekara y Manonmani 2007, Zhang *et al.* 2007, Kumar *et al.* 2008, Lakshmi *et al.* 2008, Singh 2008, Kim y Ahn 2009).

En el caso de los hongos ligninolíticos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta*, *Pycnoporus coccineus* y varias especies del género *Ganoderma*, son los más estudiados por su gran habilidad para transformar diversos compuestos xenobióticos debido a que poseen laccasas (Lac), mangesoperoxidasas (MnP) y ligninoperoxidasas (LiP) (Harvey y Thurston 2001, Maloney 2001). Estas enzimas les permiten degradar eficientemente hidrocarburos del petróleo, insecticidas organoclorados, insecticidas organofosforados, herbicidas y fungicidas (Cuadro 2.8) (Field *et al.* 1992, Alleman *et al.* 1993,

Adam-Ali y Wainwright 1994, Münchnerová y Augustin 1994, Masaphy *et al.* 1996, Rüttimann-Johnson 1997, Maloney 2001, Jauregui *et al.* 2003, Matsubara *et al.* 2006, Guillén *et al.* 2009).

Bastos y Magan (2009) estudiaron la degradación de atrazina en suelo y encontraron que *Trametes versicolor* degradó el herbicida hasta en 98 y 85.5%. Escobar *et al.* (2002) encontraron que *Pleurotus ostreatus* y *Auricularia fuscosucciona* fueron capaces de degradar endosulfán. Por su parte, Karas *et al.* (2011) sometieron especies de hongos para el tratamiento de aguas residuales de un empaque de alimentos agrícolas, encontraron que *T. versicolor*, y *Pleurotus ostreatus* degradaron imazalil, metil tiofanato, clorpirifós, ortofenil-fenol y difenilamina, la degradación de estos dos últimos plaguicidas ocurrió cuando incrementó la actividad de las enzimas MnP y Lac. El aumento en la actividad de MnP en la degradación de plaguicidas también es documentada por Wirén-Lehr *et al.* (2001) quienes encontraron que *P. chrysosporium* degradó isoproturón hasta en 91% después de 14 días de incubación y que la degradación del herbicida coincidió con el aumento de la actividad de MnP.

Sin embargo, la degradación de plaguicidas no siempre ocurre bajo condiciones ligninolíticas, tal es el caso de la investigación de Dhawale *et al.* (1992) en la que documentan que *P. chrysosporium* fue capaz de degradar fenantreno en condiciones no ligninolíticas, lo que sugiere que la biodegradación de plaguicidas no está condicionada a la participación de sistemas enzimáticos ligninolíticos. Así mismo, Kim *et al.* (2001) encontraron una degradación del 60% de endosulfán por parte de *P. chrysosporium* en menos de cuatro días, pero dicha degradación ocurrió bajo condiciones no ligninolíticas. De igual forma, los estudios de Kullman y Matsumura (1996) y Kamei *et al.* (2011) sugieren que *P. chrysosporium* y *Trametes hirsuta*, respectivamente, fueron capaces de degradar endosulfán mediante diversas rutas metabólicas y alguna de ellas no involucra necesariamente la acción de enzimas peroxidadas.

Cuadro 2.8 Degradación y acumulación de compuestos xenobióticos degradados por los géneros de hongos filamentosos de interés en esta revisión.

Microorganismo	Compuesto	Referencias	
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	pentaclorofenol	Alleman <i>et al.</i> 1993	
	benomil	Adam-Ali y Wainwright 1994	
	cianidina	Cabuk <i>et al.</i> 2006	
	dieldrin, simazina, trifluralina	Fragoero y Magan 2008	
	lindano	Moguín <i>et al.</i> 1997	
	Azinfós metil, terbufós, fosmet	Jauregui <i>et al.</i> 2003	
	endosulfán	Kamei <i>et al.</i> 2011	
	clorpirifós	Karas <i>et al.</i> 2011	
<i>Trametes versicolor</i>	atrazina	Bastos y Magan 2009	
	cianidina	Cabuk <i>et al.</i> 2006	
	dieldrin, simazina, trifluralina	Fragoero y Magan 2008	
	clorpirifós	Karas <i>et al.</i> 2011	
<i>Fusarium</i>	creosota	Atagana 2004	
	fenol, bisfenol	Cai <i>et al.</i> 2007, Chai <i>et al.</i> 2005	
	atrazina, glifosato	Jeffery y Burgess 1990, Kauffman y Blake 1970	
	DDT	Mitra <i>et al.</i> 2001	
	lindano	Sagar y Singh 2011	
	carbendazim	Saien y Kezrainjoo 2008	
	Benzopireno y HPA	Veigne <i>et al.</i> 2004, Verdin <i>et al.</i> 2005	
	trifluralina	Yu <i>et al.</i> 1988	
	<i>Penicillium</i>	bisfenol	Chai <i>et al.</i> 2005
		creosota	Atagana 2004
Atrazina, toludina		Kauffman y Blake 1970 y 1973	
Pyreno		Launen <i>et al.</i> 2000	
HPA		Mancera-López <i>et al.</i> 2008	
<i>Mucor</i>	benzopireno	Dan <i>et al.</i> 2006	
	Dieldrin, heptaclor, DDT	Kataoka <i>et al.</i> 2010	
	HPA	Silva-Jiménez y Zazueta-Sandoval 2005	
<i>Trichoderma</i>	HPA	Argumedo De Lira <i>et al.</i> 2012	
	Arsénico	Su <i>et al.</i> 2010	
	diclorvos	Tang <i>et al.</i> 2009	
	endosulfan	Katayama y Matsumura 2009	

Algunos hongos no ligninolíticos también tienen la capacidad de degradar plaguicidas y otros contaminantes. Géneros y especies de hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* y *Fusarium* son capaces de degradar hidrocarburos alifáticos y poliaromáticos (Veignie *et al.* 2004, Verdin *et al.* 2005, Kim y Lee 2007, Mancera-López *et al.* 2008, Argumedo-Delira *et al.* 2012), plaguicidas y otros compuestos xenobióticos (Cuadro 2.8).

Hangler *et al.* (2007) encontraron que *Cunningamella elegans* degradó isoproturon hasta en 95%. Szewczyk y Dlugonski (2009) observaron que *Mucor ramosissimus* degradó PCP hasta sus metabolitos tetraclorohidroquinona (TCHQ), 2,3,5,6-TCP y 2,3,4,6-TCP. Por su parte, Torra-Reventós *et al.* (2004) encontraron que *Aspergillus niger* degradó tiobencarb (20 mg L⁻¹) en 16 días, y molinato y butaclor (100 mg L⁻¹) en 7 días. Sagar y Singh (2011) encontraron que *Fusarium solani* presentó crecimiento micelial en presencia de diferentes concentraciones de lindano.

2.8.1 Biobeds o sistemas de biopurificación (BPS)

El conocimiento de la capacidad de los microorganismos para degradar compuestos xenobióticos, ha permitido implementar dispositivos de degradación de plaguicidas controlados conocidos como Biobeds o sistemas de biopurificación (BPS). Estos dispositivos se conformaron originalmente por una mezcla de paja, turba o composta y suelo (biomezcla 50:25:25), colocado a 60 centímetros de profundidad en el suelo, cubierto por una superficie de pasto y con una rampa para soportar el equipo de aplicación (Figura 2.11) (Castillo *et al.* 2008). Los BPS se implementaron inicialmente en Suecia en 1993 con el fin de minimizar la contaminación puntual por plaguicidas en las zonas de preparación de mezclas de plaguicidas y lavado de equipo de aplicación, que implica un riesgo de contaminación importante de canales de agua, aguas

superficiales y de mantos freáticos y acumulación de plaguicidas en el suelo (Torstensson y Castillo 1997, Torstensson 2000, Castillo *et al.* 2008).

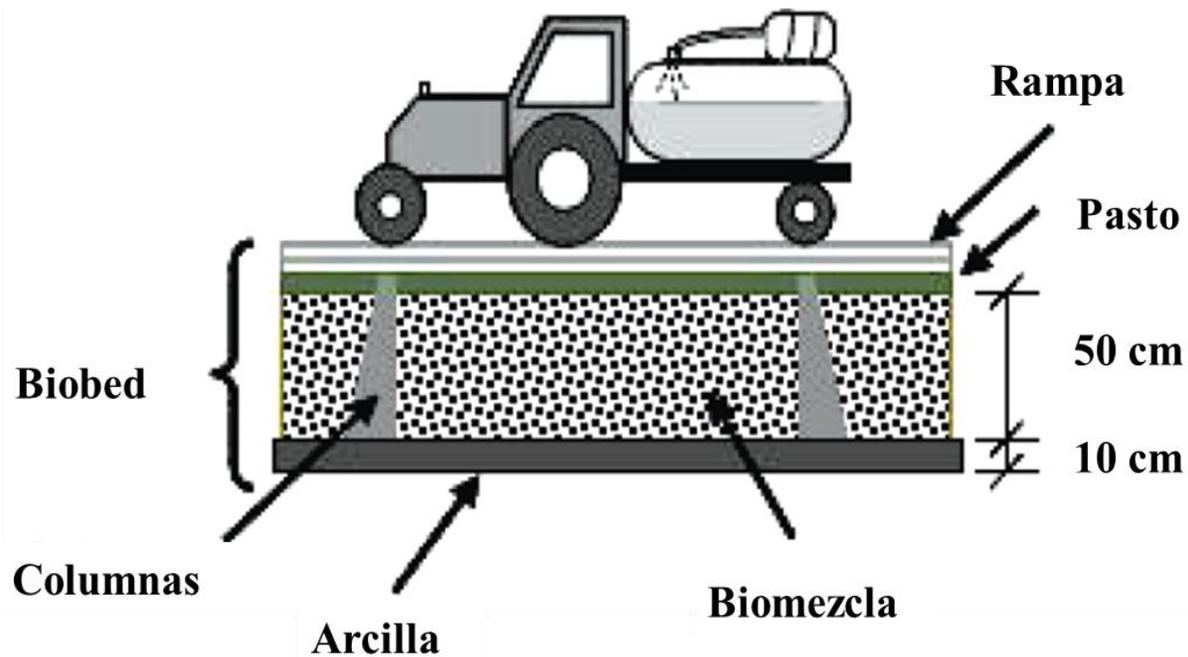


Figura 2.11 Esquema de una biobed (Fuente: Castillo *et al.* 2008)

Los BPS han demostrado contribuir de manera eficiente y económica en la disminución de contaminación puntual de plaguicidas, ya que se han implementado más de 1500 BPS en varios países de Europa principalmente y algunos en América latina, todas ellas se han adaptado a las condiciones climáticas y necesidades de cada país (Castillo *et al.* 2008). Una de las adaptaciones de los BPS más relevantes son su uso como biofiltros para degradar plaguicidas en fuentes naturales de agua contaminada con plaguicidas o agua utilizada para el tratamiento de frutas durante la postcosecha (Castillo *et al.* 2008, Karanasios *et al.* 2012, Marinozzi *et al.* 2012, Omirou *et al.* 2012). En este sentido, los estudios se han orientado a la búsqueda de las proporciones de biomezcla, diferentes orígenes de la biomezcla, temperatura, pH y humedad que

permitan la mayor degradación y en menor tiempo (Fogg *et al.* 2001, Coppola *et al.* 2007, Castillo y Tortensson 2007, Castillo *et al.* 2008, Vischetti *et al.* 2008, Karanasios *et al.* 2012).

La composición de la biomezcla y la microbiota que ésta aporta, juegan un papel crucial en la degradación de plaguicidas en los BPS, el conocimiento sobre las comunidades microbianas y su respuesta con los plaguicidas en estos sistemas permitirían la optimización de su funcionamiento. Sin embargo, poca información se tiene al respecto (Karanasios *et al.* 2012, Marinozzi *et al.* 2012).

Se sabe que la degradación de ciertos plaguicidas muy persistentes en los BPS, ocurre por procesos de cometabolismo ante la presencia de paja o materiales lignocelulósicos, en ausencia de turba y con pH alcalino el sistema induce a la degradación por actividad bacteriana principalmente (Castillo y Tortensson 2007, Karanasios *et al.* 2012). Para aumentar la capacidad y la velocidad de degradación en los BPS, se ha buscado favorecer el desarrollo microorganismos con gran capacidad degradadora, como los hongos blancos de la raíz, brindándoles sustratos ricos en ligninocelulosa y pH bajo; no obstante, el potencial de estos hongos puede ser inhibido debido la rápida invasión y competencia de mohos y bacterias en los sustratos (Karanasios *et al.* 2012). Una alternativa es la adición de suelo o biomezclas enriquecidas con una comunidad de microorganismos previamente expuestos a ciertos plaguicidas y que eventualmente han desarrollado la capacidad de degradarlos (Önneby *et al.* 2010, Karanasios *et al.* 2012). Los hongos no ligninolíticos con gran habilidad de colonización como *Mucor* y *Trichoderma* son un buen ejemplo, además de que son capaces de degradar plaguicidas al igual que los géneros *Fusarium* y *Penicillium*.

2.9 JUSTIFICACIÓN

La revisión de literatura da un panorama general de la enorme cantidad de plaguicidas que se vierten al ambiente, de su gran movilidad, de la capacidad de bioacumulación y el riesgo que implica para la salud humana y la vida silvestre. Entre los plaguicidas, destacan el endosulfán, clorpirifós y clorotalonil, por su uso extensivo en un gran número de cultivos para el control de diversas plagas y enfermedades en todo el mundo, además de que presentan moléculas o metabolitos persistentes, y estar catalogados como carcinógenos y disruptores endócrinos. Ante la crítica situación de contaminación por plaguicidas y otros compuestos se ha propiciado la búsqueda de técnicas biológicas efectivas de remoción y degradación de xenobióticos (biorremediación), entre las que están el uso de microorganismos (bacterias y hongos).

En cuanto a los hongos, las investigaciones se realizan principalmente con aquellos que poseen un sistema enzimático que les permite degradar fácilmente los contaminantes, tal es el caso de los hongos ligninolíticos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, y otros hongos blancos de la raíz. Sin embargo, existen géneros de hongos no ligninolíticos que han demostrado buena capacidad de degradación de contaminantes, como *Trichoderma*, *Fusarium* y *Aspergillus*. Cabe mencionar que los estudios de degradación con estos géneros de hongos, tanto ligninolíticos como no ligninolíticos, están dirigidos básicamente a la degradación de hidrocarburos del petróleo, creosota, o cianidinas y con respecto a los plaguicidas, las investigaciones comprenden la degradación de pentaclorofenol, organoclorados como DDT, lindano o heptaclor, herbicidas como atrazina, trifluralina o isoproturón y fungicidas como benomil.

Existen varios estudios de biodegradación de endosulfán con *P. chrysosporium*, algunos con *T. versicolor* y *Trichoderma*, pero poca información se tiene de la capacidad de degradación con hongos como *Fusarium*, *Mucor* y *Penicillium*. Con el género *Alternaria* la información es

nula. La misma tendencia ocurre con el insecticida clorpirifós y en el caso de la biodegradación de clorotalonil, la información se limita a estudios *in vitro* con bacterias o efecto sobre microorganismos en suelo. Por lo anterior, la presente investigación contribuye en la generación de información básica de la tolerancia y degradación de endosulfán, clorpirifós y clorotalonil con hongos no ligninolíticos como *Fusarium* sp, *Mucor circinelloides*, *Penicillium janthinellum*, *Arternaria alternata*, *Trichoderma koningii*, y hongos ligninolíticos de referencia como *P. chrysosporium* y *T. versicolor*.

Por otro lado, el conocimiento de las habilidades degradadoras de los microorganismos ha permitido el desarrollo de sistemas de biopurificación o biobeds cuyo objetivo es minimizar la contaminación mediante la degradación de plaguicidas. Para acelerar la biodegradación de plaguicidas en la biobed se pueden adicionar biomezclas enriquecidas con una comunidad de microorganismos predispuestos a la degradación de plaguicidas. Esta investigación contribuye además en la selección de cepas de hongos provenientes de paja de trigo y suelo agrícola tolerantes a plaguicidas como endosulfan, clorpirifós y clorotalonil, como parte inicial de la búsqueda de hongos degradadores de plaguicidas con el fin de utilizarlos a futuro en procesos de biorremediación.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo General

- Evaluar la tolerancia y capacidad de degradación de hongos filamentosos aislados de suelo agrícola y paja de trigo, hacia los plaguicidas endosulfán, clorpirifós y clorotalonil.

3.1.1 Objetivos particulares

1. Seleccionar cepas de hongos filamentosos aisladas de suelo agrícola y paja de trigo, tolerantes a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil
2. Identificar morfológica y molecularmente las cepas de hongos filamentosos tolerantes.
3. Medir el desarrollo de biomasa fúngica ante la presencia de endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en el medio de cultivo sólido.
4. Evaluar la capacidad de degradación de las cepas de hongos seleccionadas como tolerantes a los plaguicidas en estudio, en ensayos *in vitro*.
5. Comparar el desarrollo micelial y la biomasa fúngica de los hongos aislados y seleccionados con cepas de hongos ligninolíticos de referencia.

3.2 Hipótesis General

- Los hongos provenientes de suelo agrícola con uso intensivo de plaguicidas y paja de trigo son capaces de tolerar y degradar plaguicidas.

3.2.1 Hipótesis Particulares

1. Los hongos aislados de suelo y paja de trigo molida son capaces de tolerar y degradar plaguicidas como endosulfán, clorpirfós y clorotalonil.
2. Los hongos no ligninolíticos aislados presentan diferentes grados de tolerancia a los plaguicidas en estudio.
3. La biomasa fúngica puede verse afectada por la presencia de endosulfán, clorpirfós y clorotalonil en el medio.
4. El fungicida clorotalonil puede afectar el desarrollo micelial y formación de biomasa fúngica.

CAPÍTULO IV

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS

TOLERANTES A ENDOSULFÁN

RESUMEN

La contaminación por plaguicidas es un tema de preocupación general por los riesgos a la salud humana y fauna silvestre. La degradación de plaguicidas mediante el uso de hongos es una valiosa herramienta en la biorremediación de zonas contaminadas; sin embargo, es necesario conocer las características de los hongos y su capacidad de tolerancia a los compuestos que se desea degradar. En este trabajo se aislaron cepas de paja de trigo y suelo agrícola, se caracterizaron morfológicamente e identificaron molecularmente, y se evaluó el desarrollo micelial (DM) en presencia de 250, 500 y 1000 mg L⁻¹ de endosulfán (EN) comparado con tres cepas de referencia *Phanerochaete crhysosporium* (PC), *Trichoderma koningii* (TRI) y *Trametes versicolor* (TV), con el fin de preseleccionar las cepas tolerantes a plaguicidas. Se obtuvieron siete cepas de paja de trigo molida, K1P (*Fusarium proliferatum*), K2P (*F. succisae*), K8P (*F. moniliforme*), K9P (*F. proliferatum*), K12P (*F. moniliforme*), K13P (*F. succisae*), K14P (*F. moniliforme*), cuatro cepas de suelo agrícola, K1S (*F. oxysporium*), K8S (*Penicillium janthinellum*), K11S (*F. equiseti*), K14P (*Mucor cicinelloides*) y dos de trozos de paja K3TP (*F. moniliforme*) y K11TP (*Alternaria alternata*). Las cepas de referencia (PC, TRI, y TV) y la cepa K14S tuvieron el mejor DM, aunque fueron afectadas por la presencia del insecticida se recuperaron totalmente entre los 8 y 16 días después expuestas a EN. La cepa K8S, presentó crecimiento lento y ligero retraso en el DM ante EN pero no hubo diferencias significativas con el testigo absoluto (TA). La cepa K11TP tuvo crecimiento lento, sin embargo, ante 250 y 500 mg de EN L⁻¹ y el solvente acetona su desarrollo fue mejor y más rápido, mientras que las cepas K2P y K14P mostraron desarrollo medio y efecto negativo en el DM en presencia de EN pero con buena recuperación. Las cepas K1S y K3TP tuvieron crecimiento lento pero con recuperación en su DM. Se seleccionaron siete cepas tolerantes con potencial para ser evaluadas para su tolerancia hacia clorpirifós y clorotalonil.

Palabras clave: caracterización, identificación molecular, tolerancia, endosulfán, plaguicidas

CHAPTER IV

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND SCREENING OF FILAMENTOUS FUNGI AGAINST ENDOSULFAN

ABSTRACT

Contamination by pesticides is of general concern since it represents high risks for human health and wild fauna. Pesticide degradation through the utilization of fungi is an important biotechnological tool in the bioremediation of contaminated areas; however, it is necessary to know the main fungal characteristics and the fungal tolerance to target contaminants. This study isolated fungal strains from wheat straw and agricultural soil which were also morphologically characterized and molecularly identified. The strains were tested for their tolerance to three doses of endosulfan (EN) 250, 500 and 1000 mg L⁻¹, and by comparing their mycelial growth (MG) with that from three reference fungal strains *Phanerochaete crhysosporium* (PC), *Trichoderma koningii* (TRI) and *Trametes versicolor* (TV). The later allowed the screening of those strains with good tolerance to EN. Seven fungal strains were obtained from powder wheat straw K1P (*Fusarium proliferatum*), K2P (*F. succisae*), K8P (*F. moniliforme*), K9P (*F. proliferatum*), K12P (*F. moniliforme*), K13P (*F. succisae*), K14P (*F. moniliforme*); four were isolated from agricultural soil, K1S (*F. oxysporium*), K8S (*Penicillium janthinellum*), K11S (*F. equiseti*), K14P (*Mucor cicinelloides*), and two were isolated from fragments of wheat straw K3TP (*F. moniliforme*) and K11TP (*Alternaria alternata*). The reference fungal strains (PC, TRI, and TV) and the strains K14S showed better MG, but in spite of being affected by the EN they totally recovered after 8 and 16 days. The strain K8S showed a slow and delay on its MG due to EN, but it did not have significant differences to the MG obtained at the absolute control (TA). The growth of the strain K11TP was slow, however at 250 and 500 mg EN L⁻¹ and at in the presence of acetone its growth was improved and fast whereas the strains K2P and K14P had inhibited MG, but with good recovery after 18 days. There were selected seven fungal strains with good tolerance to EN, and these strains have good potential for being assayed for further evaluation of their tolerance to chlorpyrifos and chlorothalonil.

Key words: characterization, identification, tolerance, endosulfan, pesticides

4.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, miles de compuestos xenobióticos tóxicos como hidrocarburos poliaromáticos (HPA), bifenilos policlorados y plaguicidas se han liberado en el ambiente, y el uso de éstos últimos se ha incrementado dramáticamente con el aumento en la producción agrícola, el mal uso de los plaguicidas ha derivado en una fuerte contaminación ambiental y riesgo para la salud humana (Chaudry *et al.* 2005, Hu *et al.* 2009, Diez 2010, Zhang *et al.* 2011). La degradación biológica de plaguicidas es una efectiva medida de descontaminación, los microorganismos tienen gran versatilidad fisiológica que les permite metabolizar, mineralizar y degradar compuestos tóxicos (Alexander 1999, Diez 2010, Varsha *et al.* 2011). Entre los microorganismos, las bacterias y hongos son los más utilizados para la biotransformación de plaguicidas. Los hongos tienen ciertas ventajas sobre las bacterias, ya que por el desarrollo micelial son capaces de penetrar los sustratos hasta alcanzar la fuente de carbono (Cerniglia y Sutherland 2001). Los hongos ligninolíticos han llamado la atención debido a su potencial en la biorremediación ya que las enzimas involucradas en la degradación de compuestos lignocelulósicos son extracelulares y pueden degradar un amplio rango de contaminantes, lo que los hace candidatos atractivos para “limpiar” zonas contaminadas (Cerniglia y Sutherland 2001, Maloney 2001).

La degradación de plaguicidas mediada por microorganismos en el ambiente es fortuita, de la biodisponibilidad del contaminante dependerá el éxito de la degradación (Cerniglia y Sutherland 2001, Chaudri *et al.* 2005). En la biorremediación se busca mantener la biodisponibilidad del contaminante y asegurar la presencia de los microorganismos que los degraden, un ejemplo son las tecnologías desarrolladas con la finalidad de mitigar la contaminación de plaguicidas como las biobeds; en estos dispositivos de biorremediación se propician las condiciones ideales para

acelerar la biodegradación de plaguicidas. Los componentes de las Biobeds como la paja de trigo, el suelo y la composta (biomezcla), favorecen el desarrollo de hongos ligninolíticos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Berjkandera adusta* (Coppola *et al.* 2007, Vischetti *et al.* 2008). Sin embargo, estos hongos pueden ser inhibidos por otros hongos no ligninolíticos presentes en las biomezclas (Karanasios *et al.* 2012) que en un momento dado también pueden tolerar y degradar plaguicidas. Por ello, este trabajo consistió en aislar hongos filamentosos provenientes de paja de trigo y suelo agrícola con el fin de realizar una selección inicial de aquellos hongos tolerantes en endosulfán, y para posteriores pruebas con otros plaguicidas considerados en esta investigación doctoral.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Colecta de suelo y paja

El suelo se colectó en un campo agrícola con uso intensivo de plaguicidas en el sitio el Garambullo, tabla 1 del Rancho Aguilares Municipio de Silao, Guanajuato en Mayo de 2007. En un área de una hectárea se marcaron 5 cuadrantes de 10 x 10, cuatro periféricos y uno central; en cada cuadrante, con ayuda de una pala, se tomaron 5 submuestras de suelo de aproximadamente 1 kg cada una, se colocó el suelo en bolsas de plástico, se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración a 4° C hasta su uso.

La paja de trigo se colectó en un campo agrícola aledaño al sitio de colecta del suelo, se tomaron 10 submuestras de paja en un transepto lineal de 50 metros.

4.2. 2. Aislamiento de hongos filamentosos

En una caja de Petri se colocaron 15 g de suelo y en otra caja 15 g de paja de trigo molida, se colocaron en estufa a 110° C hasta obtener peso constante de cada sustrato. Se pesó 1 g del suelo seco y condiciones de asepsia se colocaron en un frasco de dilución con 90 mL de agua destilada esterilizada, se agitó durante 10 minutos y se hicieron diluciones seriales de 10^{-1} hasta 10^{-4} , esta actividad se aplicó también para la paja en polvo.

La siembra de las diluciones de suelo y paja se realizaron en condiciones estériles, con el método de extensión superficial (Ramírez-Gama *et al.* 1998) que consiste en colocar con una micropipeta, una alícuota de 100 μ L de la dilución respectiva en el centro de una caja Petri que contenía medio papa-dextrosa-agar (PDA) y rosa de bengala (RB). Con la ayuda de una varilla de vidrio con ángulo (espátula de Drigalski) y flameada previamente, la alícuota se distribuyó en toda la superficie del medio de cultivo, tanto para las diluciones de suelo como para las de paja molida, se hicieron 5 repeticiones. Las cajas sembradas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 28° C durante 5-8 días. Transcurrido el periodo de incubación se llevaron a cabo los conteos de la dilución 10^{-3} con el fin de obtener las unidades formadoras de colonias en 1 mL g^{-1} de suelo o de paja de trigo molida (UFC g^{-1}).

Además se sembraron trozos de paja (sin moler), previamente desinfectados en una solución de cloro 0.1% durante 3 minutos, en medio PDA+RB, con 5 repeticiones y se incubaron a 28° C por 5-8 días.

4.2.3 Purificación de cepas aisladas y cultivos monospóricos

De las cajas de Petri sembradas con suelo, paja de trigo molida o trozos de paja de trigo, se seleccionaron los hongos filamentosos con apariencia diferente, resembrándolas en cajas de Petri

con PDA con ayuda de un asa bacteriológica y por triplicado. Las cepas fueron identificadas con claves anteponiendo la letra K, el número consecutivo correspondiente, y al final una “P” si éstas provenían de la paja molida, una “S” si provenían del suelo y “TP” si se aislaron de los trozos de paja.

De las cepas aisladas y purificadas se hicieron cultivos monospóricos con el fin de obtener colonias de un solo conidio. En condiciones de asepsia y con ayuda de una micropipeta, se colocaron 5 mL de agua destilada esterilizada sobre una colonia fúngica de 5-7 días de desarrollo y se realizó un raspado con una espátula esterilizada; se tomó 1 mL de la solución de esporas y se colocó en un frasco con 20 mL de solución tween 0.03% previamente esterilizado. De la solución de tween con esporas se tomó 1.0 mL, se colocó y dispersó sobre la superficie de una caja de Petri con agar-agua. Este proceso se realizó para cada una de las cepas purificadas.

Los conidios germinaron después de 1-2 días de la inoculación. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se localizaron los conidios germinados y se transfirieron a una nueva caja de Petri con medio PDA, las cajas se incubaron a 28° C por 10 días; se realizaron 5 repeticiones para cada cepa.

4.2.4 Caracterización macroscópica, microscópica y molecular de las cepas

La caracterización macroscópica de las cepas fúngicas obtenidas se realizó observando las características de la colonia, consistencia, color y pigmentos. La caracterización microscópica, se realizó al observar preparaciones en portaobjetos tiñendo con azul de algodón y microcultivos con la técnica de Riddell (1950), observando en microscopio óptico el tipo de micelio, tipo de cuerpos fructíferos y tipo de esporas (Ramírez-Gama *et al.* 1998).

Para la identificación molecular se realizó la extracción de ADN, amplificación y secuenciación de las cepas. La extracción de ADN se llevó a cabo según el método AP (Sambrook y Russel 2001), la integridad de ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 80 volts por 40 minutos en buffer TBE y teñido con bromuro de etidio.

Las regiones ITS1 e ITS2 se amplificaron por PCR con los indicadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990), los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 580 pares de bases (pb).

La PCR se realizó en un termociclador (Applied BiosystemsTM 2720), en una reacción de 25 μ L [1.0 μ L de cada indicador (10 mM), 1.0 μ L de dNTP (10 mM), 5 μ L de buffer de PCR 10X, 2.5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ L de Taq Polymerasa, 0.5 μ L de ADN molde y 13.5 μ L de agua libre de nucleasas]. Se utilizaron como control negativo reacciones de amplificación sin ADN templado. La PCR consistió de una desnaturalización inicial de un ciclo de 95° C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 95° C durante un minuto, otro de 57° C por un minuto, después un ciclo de 72° C por un minuto y una extensión final a 72° C durante 10 min.

La secuenciación de los productos de PCR fue realizada por Macrogen, Korea, dichas secuencias se alinearon con secuencias depositadas en el banco de genes y la homología se determinó en el servidor National Center for Biological Information (NCBI 2011).

4.2.5 Pruebas de patogenicidad

Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad en jitomate con las variedades Río Grande y Río Colorado y con trigo susceptible a *Fusarium*, en condiciones de invernadero. Las semillas de

jitomate se sembraron en charolas de germinación con Peat Moss esterilizado previamente y se mantuvieron con riego constante para mantener la humedad hasta que alcanzaron aproximadamente 15 cm de altura. La solución de esporas se realizó en condiciones de esterilidad colocando 5 mL de agua esterilizada en la caja Petrí que contenía una colonia fúngica de entre dos y seis días de crecimiento. Se hizo un raspado del micelio con la punta de la micropipeta y se filtró la suspensión en un embudo con fibra de vidrio previamente esterilizado. Todas las suspensiones de esporas de cada una de las cepas se ajustaron a una concentración de 3.0×10^6 esporas mL^{-1} .

Las plántulas se sacaron de la charola de germinación y se retiró todo el sustrato hasta dejar la raíz limpia, las plántulas se sumergieron en 50 mL de la solución de esporas correspondiente durante dos minutos y se trasplantaron a una maceta con sustrato previamente esterilizado. Se colocaron 4 plántulas por maceta con cuatro repeticiones tanto para la variedad Rio Grande como para la variedad Rio Colorado. Se hicieron cinco conteos cada 8 días para observar síntomas de enfermedad, las plántulas se mantuvieron en invernadero con riego para mantener la humedad del sustrato.

Las semillas de trigo fueron donadas por el Dr. Julio Huerta Espino del Centro de Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT). La desinfestación de las semillas se realizó con el método propuesto por Velázquez-Barrón y Fuentes-Dávila (2009) con algunas modificaciones (Anexo I). La desinfestación de semillas, la siembra y la inoculación se realizaron en condiciones de asepsia, excepto los riegos en invernadero; no obstante, para los riegos se utilizó agua esterilizada.

Se colocaron cinco semillas desinfestadas por frasco de germinación previamente esterilizados. Los frascos de germinación constaban de un papel filtro húmedo con tapa de papel

estruza sujeta por una liga y durante la germinación se agregaron 3 mL de agua destilada esterilizada cada dos días, en condiciones de asepsia. A los cinco días de la siembra se realizó la inoculación, se probaron las 13 cepas de hongos aislados y las tres cepas de referencia PC, TV y TRI. Las plántulas se sacaron de los frascos de germinación con una pinza esterilizada; con ayuda de una hoja de bisturí esterilizada se les provocó una herida en la raíz, y posteriormente se sumergió la raíz en 50 mL de una solución de esporas a una concentración de $3.0 \times 10^6 \pm 0.5$ esporas mL⁻¹ durante tres minutos. Transcurrido ese tiempo, las plantas inoculadas se colocaron en macetas con Peat Moss, ambos previamente esterilizados. Se colocaron cinco plantas por maceta con cinco repeticiones para cada cepa y se llevaron a invernadero, se regó con agua esterilizada cada tercer día durante 17 días. En ese tiempo se observó diariamente el desarrollo de las plantas y los posibles síntomas y signos de enfermedad. Terminado el bioensayo se le retiró el sustrato de todas las plantas para verificar la posible presencia de enfermedades en la raíz.

4.2.6 Plaguicida y Cepas de referencia

El endosulfán en formulación grado técnico (98 % pureza) fue donado por Bayer Cropscience, México S.A. de C.V.

Las cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* cepa CDBBh-298 (PC) y *Trametes versicolor* (TV), son hongos ligninolíticos donados por la Dra. Refugio Rodríguez del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional. La cepa de *Trichoderma koningii* (TRI) proviene del cepario microbiano del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, y aunque no es un hongo ligninolítico, es tolerante a petróleo crudo e hidrocarburos poliaromáticos (HPA) (Argumedo-Delira *et al.* 2012).

4.2.7 Preselección de cepas tolerantes a endosulfán

Con el fin de seleccionar las cepas tolerantes a plaguicidas, se realizó un bioensayo preliminar con endosulfán (EN). Las dosis de EN probadas fueron 0, 250, 500 y 1000 mg L⁻¹; el insecticida fue diluido con acetona grado reactivo (Fermont®); y se aplicaron, como única fuente de carbono sobre medio mínimo sólido (MMS) contenido en cajas de Petri. La composición del MMS fue la siguiente (g L⁻¹): 0.5 g de (NH₄)₂SO₄, 0.5 g de KH₂PO₄, 0.2 g de KCl, 0.2 g de MgSO₄ 7H₂O, 0.1 g de CaCl₂, y 20 g de agar- agar.

La contaminación del MMS se realizó en condiciones asépticas, aplicando 100 µL de la dilución del plaguicida correspondiente y distribuida en toda la superficie de la placa de agar con la ayuda de una espátula de Drigalski. Las cajas de Petri para el testigo con acetona (Ac) fueron contaminadas con 100 µL de acetona sin plaguicida, y se permitió la evaporación de la acetona durante 24 h en todos los tratamientos.

Los plaguicidas se probaron con sus respectivas dosis por triplicado para cada una de las 13 cepas aisladas (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P, K14P, K1S, K8S, K11S, K14S, K3TP y K11T), y para las tres cepas de referencia PC, TV y TRI, incluyendo un testigo absoluto (TA) y un testigo con acetona (Ac).

La siembra de las cepas se realizó en condiciones de asepsia, colocando un sacabocados de la colonia fúngica de entre dos o seis días de edad, en el centro de la caja contaminada. Cada 24 h se midió el desarrollo del micelio (DM) midiendo el diámetro (mm) de la colonia durante los primeros ocho días. Después, la medición se llevó a cabo cada 48 h hasta los 18 días. Las cajas de Petri se mantuvieron en incubadora (New Brunswick Scientific Inc. Edison, HN. J. U. S. A.) a 26 + 1° C durante todo el bioensayo.

4.2.8 Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental completamente al azar utilizando un factorial 16x4 (diez y seis cepas de hongos y cuatro dosis). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias (Tukey $\alpha= 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS 2002).

Con el fin de obtener la tasa máxima de crecimiento (T_{max}) la cual indica el máximo desarrollo alcanzado en un punto de la curva de crecimiento ($mm\ día^{-1}$) los resultados de desarrollo micelial obtenidos, se ajustaron al modelo de Richards (Richards, 1959). Posteriormente, los datos obtenidos con el modelo se sometieron a un ANOVA y una comparación de medias (Tukey, $\alpha= 0.05$) (SAS 2002).

Para determinar la velocidad de crecimiento o desarrollo micelial de las cepas estudiadas en ausencia o presencia de los plaguicidas, se definieron los siguientes rangos con base en los valores de las tasas máximas de crecimiento: desarrollo micelial acelerado ($> 20\ mm\ d^{-1}$); desarrollo micelial mediano ($10 - 20\ mm\ d^{-1}$); y desarrollo micelial lento ($1 - 10\ mm\ d^{-1}$).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Aislamiento de Cepas

Se encontraron 29.9×10^3 unidades formadoras de colonias en un gramo de suelo agrícola seco ($UFC\ g^{-1}\ ss$), mientras que en la paja de trigo molida la población fue de $24.9 \times 10^3\ UFC\ g^{-1}$ de paja seca. Se obtuvieron cultivos monospóricos de siete cepas aisladas y purificadas de paja de trigo molida (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P y K14P), cuatro cepas de suelo agrícola (K1S, K8S, K11S y K14S) y dos de trozos de paja de trigo (K3TP y K11TP).

4.3.2 Caracterización macroscópica, microscópica y molecular

De las trece cepas aisladas, diez pertenecieron al género *Fusarium*, una al género *Penicillium*, una al género *Mucor*, y una al género *Alternaria* (Cuadro 4.1). Las cepas K1P y K9P fueron afines a *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, y las cepas K2P y K13P presentaron afinidad a *F. succisae* (Schroter) Saccardo (Cuadro 4.1). En el caso de la cepa K1S presentó afinidad a *F. oxysporum* Schlechtendahl emmend. Snyder y Hansen, y la cepa K11S a *F. equiseti* (Corda) Saccardo (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1 Cepas fúngicas obtenidas de suelo agrícola, paja de trigo molida y trozos de paja de trigo, y afinidad taxonómica de acuerdo a sus secuencias moleculares.

Sustrato de aislamiento	Clave	Primer	Especie	Porcentaje de similitud	Gene Bank (Accession)
Paja molida trigo	K1P	ITS1	<i>Fusarium proliferatum</i>	95	GQ167233.1
Paja molida trigo	K2P	ITS4	<i>F. succisae strain</i>	99	KC464634.1
Paja molida trigo	K8P	ITS5	<i>Gibberella moniliformis isolate SIDV20110221051</i>	99	KC143121.1
Paja molida trigo	K9P	ITS4	<i>F. proliferatum isolate 14</i>	99	EU839366.1
Paja molida trigo	K12P	ITS1	<i>G. moniliformis strain N25q-28</i>	99	KC292366.1
Paja molida trigo	K13P	ITS4	<i>F. succisae strain AAFC- Far 001</i>	99	KC464633.1
Paja molida trigo	K14P	ITS1	<i>G. moniliformis strain H2</i>	98	JX970629.1
Suelo agrícola	K1S	ITS5	<i>Fusarium oxysporum genomic DNA</i>	99	HE974454.1
Suelo agrícola	K8S	ITS4	<i>Penicillium janthinellum strain G2U-BCECGJL 33-1</i>	99	GU565142.1
Suelo agrícola	K11S	ITS4	<i>F. equiseti isolate GGF2</i>	99	HM008677.1
Suelo agrícola	K14S	ITS1	<i>Mucor circineloides isolate 98M- 31</i>	98	JN227054.1
Trozos paja trigo	K3TP	ITS4	<i>G. moniliformis genes</i>	99	AB374140.1
Trozos paja trigo	K11TP	ITS4	<i>Alternaria alternata strain GL22</i>	98	GQ169728.1

Las cepas K8P, K12P y K3TP fueron afines al teleomorfo *Giberella moniliformis*, mientras que K14P mostró afinidad a *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg. Para la cepa K8S, la especie determinada fue *Penicillium janthinellum* Biourge, la cepa K14S se definió como *Mucor circinelloides* van Tieghem, y K11TP como *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (Cuadro 4.1).

La cepa K1P en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) presentó micelio aéreo blanco algodonoso laxo con desarrollo concéntrico (Figura 4.1A), el micelio profundo presentó anillos concéntricos de color rosado a lila, las hifas son septadas con 3.06 μm de ancho aproximadamente, con fiálides de unos 12.63 μm de largo por 2.62 μm de ancho (Figura 4.1B). Los microconidios midieron en promedio 7.07 μm de largo por 2.8 μm de ancho (Figura 4.1D), no hubo formación de macroconidios ni clamidosporas. La secuenciación de K1P indicó afinidad con *Fusarium proliferatum* en un 95%.

Leslie y Summerell (2006) documentan que *F. proliferatum* presenta macroconidios con poca frecuencia y microconidios en cadenas cortas formadas en monofiálides y polifiálides, sin embargo, las colonias de K1P no formaron macroconidios y no se observaron conidios en cadena cortas formadas en fiálides (Figura 4.1B). No obstante, se encontraron microconidios no muy abundantes con características similares a las descritas por Leslie y Summerell (2006) al igual que otras características macro y microscópicas (Figura 4.1D).

Al igual que la cepa K1P, la cepa K9P fue afín con *F. proliferatum* en un 99% de similaridad, la apariencia de la colonia en medio PDA también presentó micelio aéreo blanco algodonoso laxo con desarrollo concéntrico (Figura 4.2A), se observó coloración blanca en el centro y con tonos rosados en la periferia tornándose violeta con el tiempo. En la cepa K9P tampoco se encontraron microconidios en cadenas cortas ni polifiálides. Sin embargo, los microconidios fueron más abundantes en forma de bastos o piriformes de 8.5 μm de largo por 3.18 μm de ancho (Figura

4.2B y D) y sin formación de clamidosporas. Se observaron pocos macroconidios de 38.01 μm de largo por 3.61 μm de ancho en promedio; las fiálides midieron en promedio 19.5 μm de largo por 3.13 μm de ancho (Figura 4.2C). Las características macro y microscópicas coinciden con las descritas por Leslie y Summerell (2006).

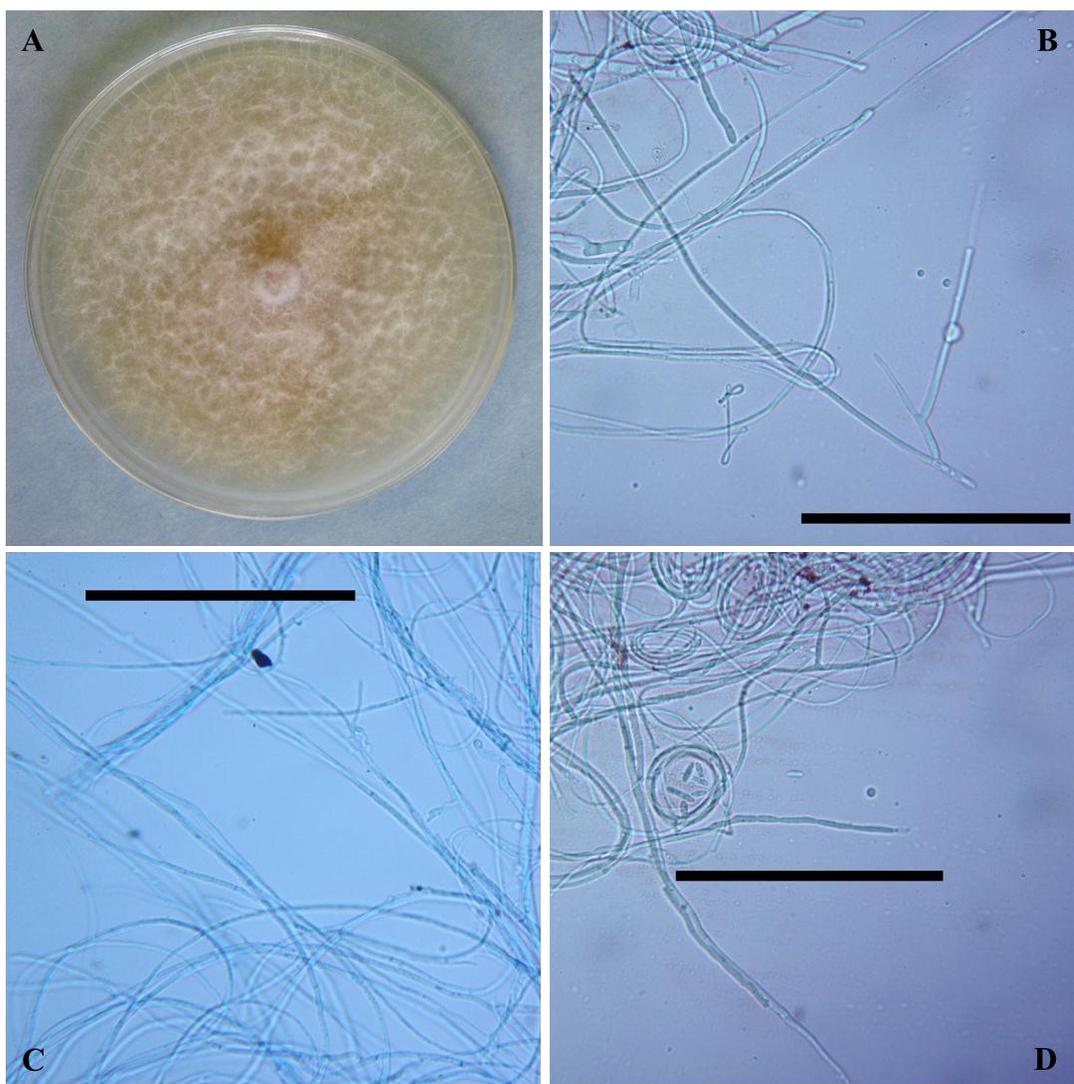


Figura 4.1 Cepa K1P [*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) fiálide. C) micelio. D) micelio y conidios. Barras= 100 μm .

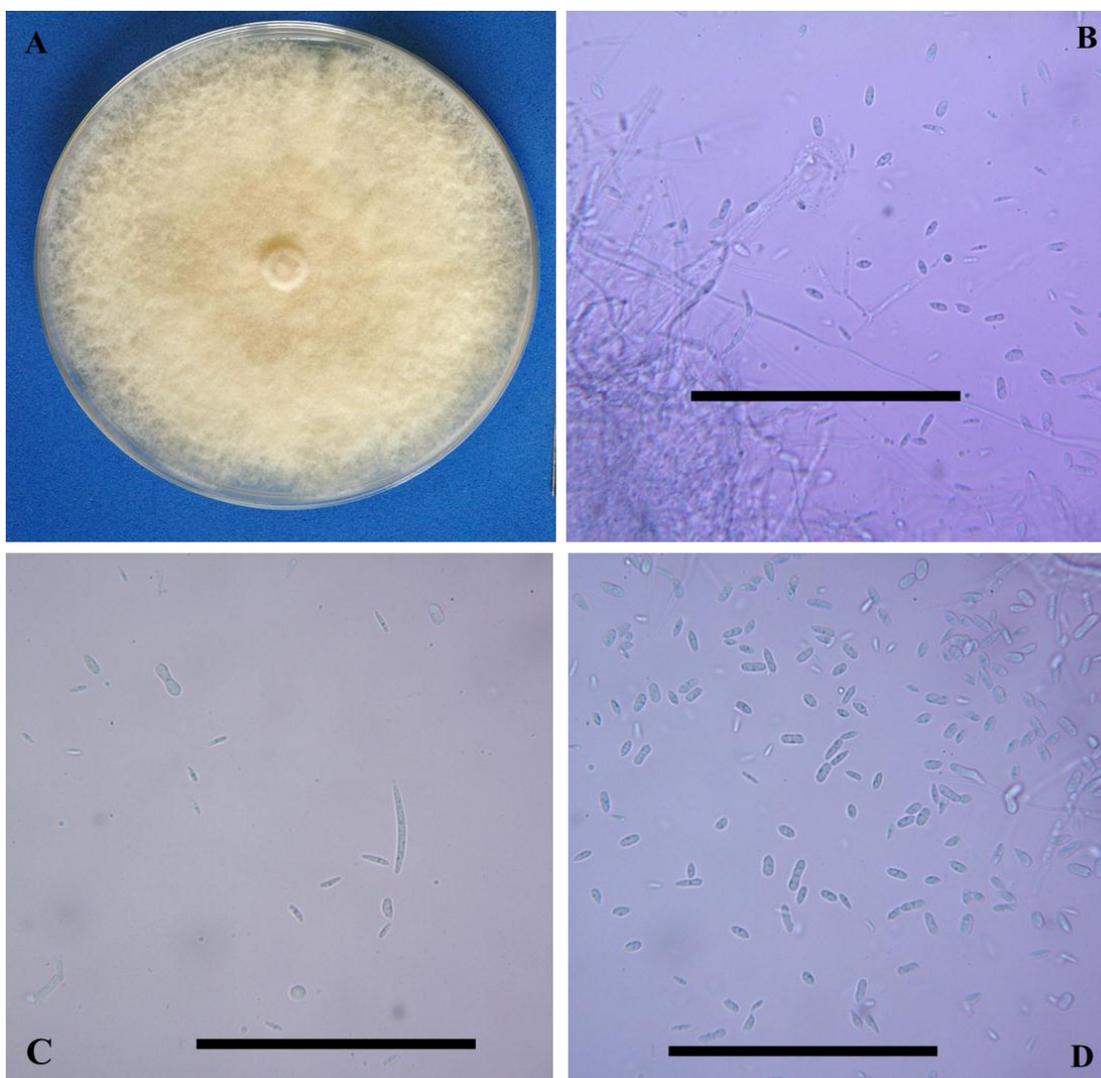


Figura 4.2 Cepa K9P [*Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) fiálide, micelio y conidios. C) macroconidio. D) microconidios. Barras= 100 μm .

Las cepas K2P y K13P presentaron afinidad con *Fusarium succisae* (Schröter) Saccardo, ambas en un 99%. K2P presentó micelio aéreo abundante lanoso, color blanco, con desarrollo concéntrico alternando anillos blancos y púrpura, la coloración púrpura grisácea apareció con el tiempo pigmentando el medio (Figura 4.3A), el micelio es septado con 2.85 μm de ancho (Figura 4.3C), no se presentaron macroconidios. Los microconidios fueron poco abundantes con medidas

que variaron desde los 5.43 hasta 20.9 μm de largo y de 2.33 a 3.96 μm de ancho, con formas ovales, alargados y ligeramente curvados (Figura 4.3B y D), no se encontraron clamidosporas.

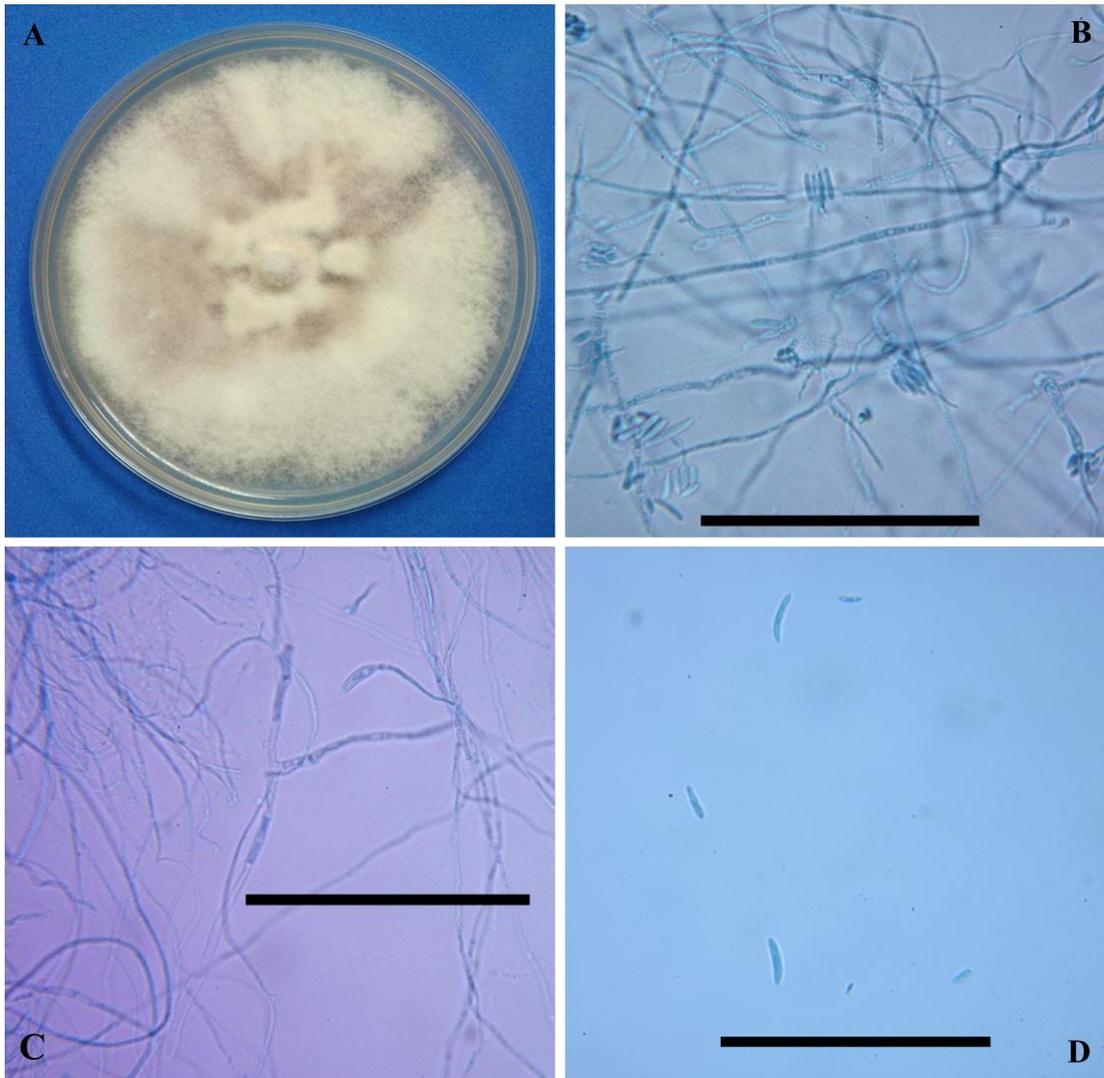


Figura 4.3 Cepa K2P [*Fusarium succisae* (Schröter) Saccardo]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio y conidios. C) conidio germinando. D) microconidios. Barras= 100 μm .

En el caso de la cepa K13P, el aspecto de las colonias en medio PDA mostraron micelio aéreo muy abundante lanoso con desarrollo concéntrico de color blanco y anillos color violeta (Figura 4.4A). El micelio es septado con medidas de entre 2.4 y 6.27 μm de ancho, se observaron fiálides

de 9.58 μm de largo por 2.43 μm de ancho en promedio (Figura 4.4B). Se encontraron pocos macroconidios de 24.44 μm de largo por 4.57 μm de ancho y ligeramente curvados (Figura 4.4C). Los microconidios se presentaron en mayor número y las medidas variaron desde 3.63 a 16.93 μm de largo y 2.22 a 6.52 μm de ancho (Figura 4.4D), no se observaron clamidosporas.

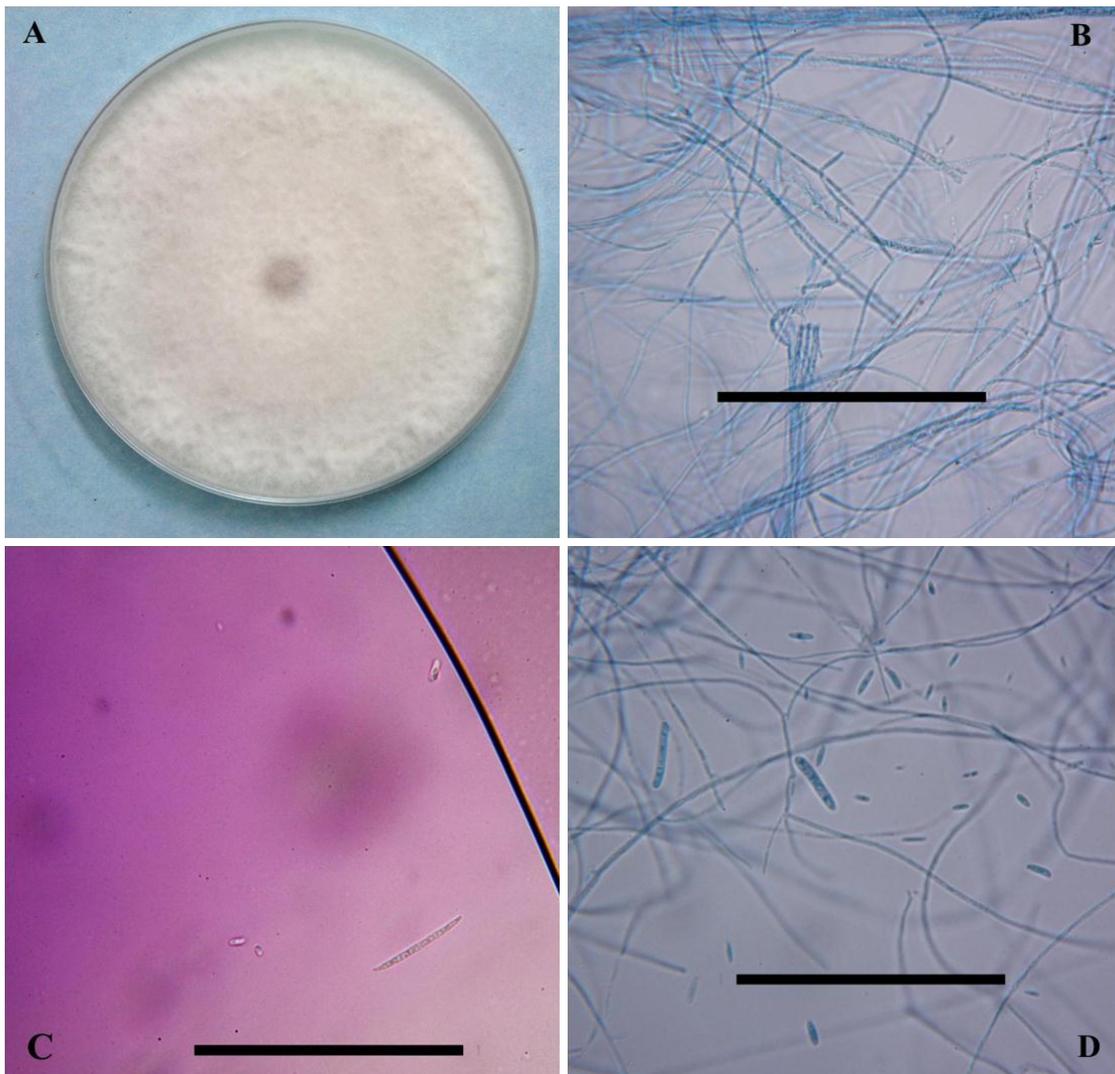


Figura 4.4 Cepa K13P [*Fusarium succisae* (Schröter) Saccardo]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio y fiálides. C) macroconidio. D) microconidios. Barras= 100 μm .

Las características macro y microscópicas tanto de la cepa K2P como K13P coinciden con las descritas por Leslie y Summerell (2006) para *F. succisae* en cuanto a la coloración de las colonias, el micelio, la forma de los microconidios y la ausencia de clamidosporas.

La secuencia de la cepa K1S mostró afinidad a *F. oxysporum* Schlechtendahl emmend. Snyder y Hansen en un 99%. El aspecto de la colonia en medio PDA mostró micelio algodonoso laxo con desarrollo concéntrico color blanco (Figura 4.5A), con el paso del tiempo el micelio profundo circunscrito a la colonia se tornó a un color violeta oscuro o púrpura. El micelio es septado de entre 1.83 y 6.23 μm de ancho (Figura 4.5B), se observaron macroconidios de entre 21.12 y 45.46 μm de largo por 3.5 y 6.5 μm de ancho algunos ligeramente curvados y la mayoría casi rectos (Figura 4.5D). Los microconidios ovalados variaron de entre 5.68 y 14.62 μm de largo y 2.77 y 5.14 μm de ancho (Figura 4.5D); las fiálides midieron en promedio 11.12 μm de largo por 1.82 μm de ancho y no se encontraron clamidosporas. La descripción tanto macro como microscópica de la cepa K1S es similar a la descrita por Watanabe (2002) y Leslie y Summerell (2006) con excepción de la formación abundante de clamidosporas.

En el caso de la cepa K11S, el desarrollo en medio PDA forma micelio algodonoso compacto de crecimiento regular color blanco al inicio y tornándose de beige a café con el tiempo (Figura 4.6A), se observó micelio septado de 3.9 μm de ancho con presencia abundante de clamidosporas de 13.12 μm de largo por 8.72 de ancho (10.92 μm de diámetro) (Figura 4.6B y C). No se formaron microconidios y los macroconidios eran abundantes, delgados y largos con cinco a siete septos y hasta 48.17 μm de largo por 5.22 μm de ancho (Figura 4.6D). La identificación mostró una similitud del 99% con *F. equiseti* (Corda) Saccardo. Leslie y Summerell (2006) describen los macroconidios de *F. equiseti* desde 25 y hasta más de 120 μm de largo y una célula basal

distintiva, en las colonias formadas de la cepa K11S se encontraron macroconidios de 49 μm de largo con la célula basal que caracteriza a esta especie (Figura 4.6D).

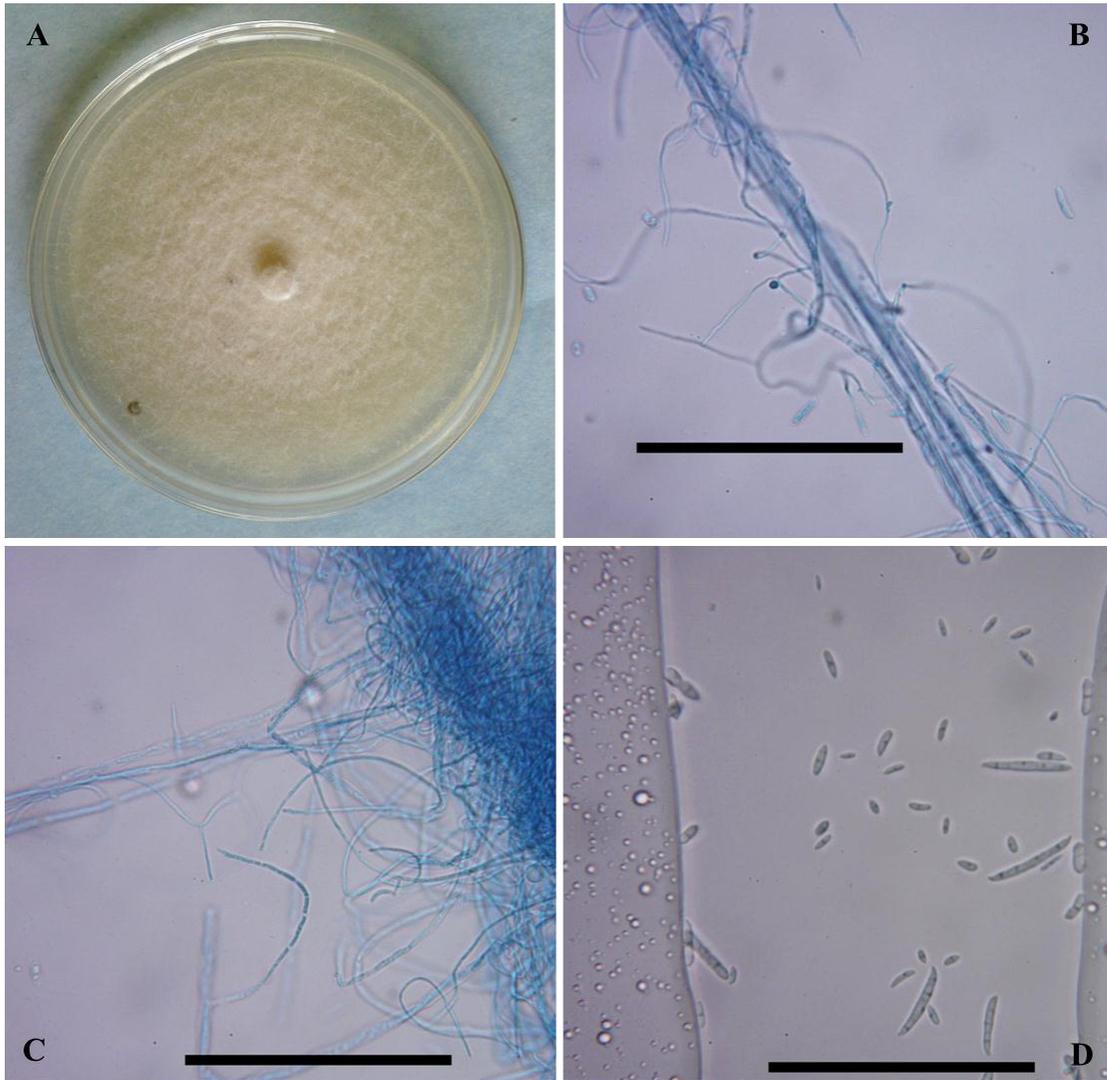


Figura 4.5 Cepa K1S [*Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emmend. Snyder y Hansen]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) conidio en fiálide. D) micro y macroconidios. Barras= 100 μm .

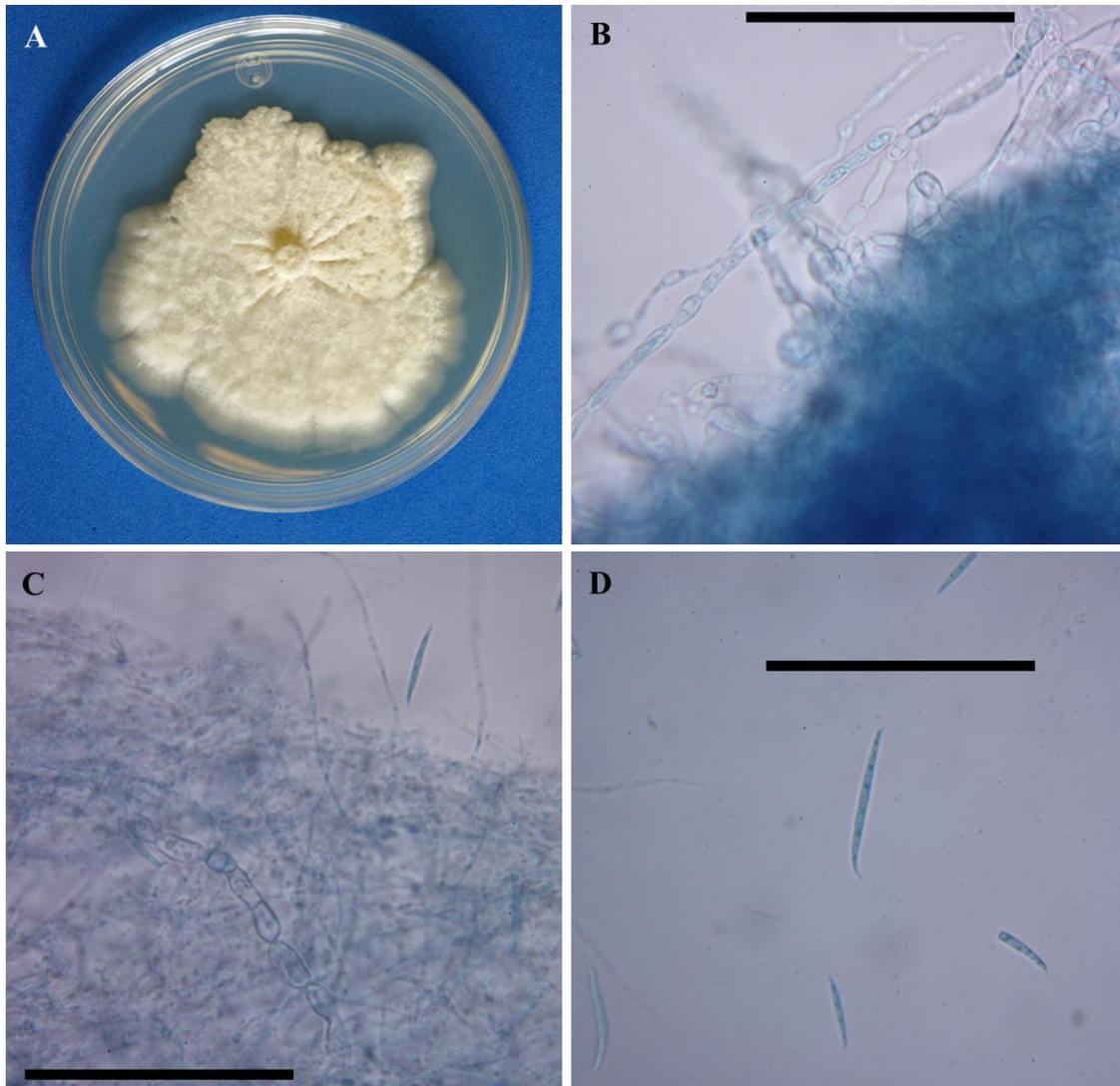


Figura 4.6 Cepa K11S [*Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) clamidosporas. D) macroconidios. Barras= 100 μ m.

En la cepa K8P se observó micelio aéreo abundante de color blanco algodonoso compacto con desarrollo concéntrico (Figura 4.7A), el micelio profundo mostró pigmentación circunscrita a la colonia alternando con anillos blanco y rosado tornándose a violeta oscuro con el tiempo. El micelio varió de 2.12 a 5.89 μ m de ancho (Figura 4.7B), se observaron monofiálides en forma de “V”, presentó microconidios ovalados o en forma de bastos sin septos, se les encontró formando cadenas largas de microconidios (Figura 4.7C). Se encontraron muy pocos macroconidios, éstos

son alargados y delgados de unos 28.36 μm de largo por 2.61 μm de ancho (Figura 4.7D) no se encontraron clamidosporas.

La K12P presentó micelio aéreo lanoso color blanco, con desarrollo concéntrico, la colonia mostró un color blanco inicial y con el tiempo se tornó rosa grisáceo (Figura 4.8A), el grosor del micelio fue de 2.11 μm de ancho en promedio (Figura 4.8B), se observaron monofiálides de 14 μm de largo por 2.57 μm de ancho (Figura 4.8C). No se encontraron macroconidios, los microconidios midieron entre 5.53 y 16.19 μm de largo y 2.14 y 4.85 μm de ancho, con forma de bastos, ovaladas y ligeramente curvados (Figura 4.8D).

En el caso de la cepa K3TP, la colonia presentó micelio algodonoso blanco con desarrollo concéntrico (Figura 4.9A), en un cultivo maduro la colonia se torna rosa claro con anillos ligeramente rosados. El grosor del micelio varió de 2.12 a 6.58 μm de ancho (Figura 4.9B), se observaron monofiálides algunas veces en forma de “V” que midieron en promedio 15.33 μm de largo por 2.25 μm de ancho (Figura 4.9C). No se encontraron macroconidios, los microconidios estaban presentes en gran número en forma de bastos u ovalados, midieron entre 4.9 y 11.49 μm de largo y 1.88 y 3.67 μm de ancho (Figura 4.9D).

Las características macro y microscópicas indicaron que las cepas K8P, K12P y K3TP son *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg según la descripción de Leslie y Summerell (2006), por otro lado, las secuencias de las tres cepas indicaron similitud con el teleomorfo *Giberella moniliformis* en un 99% (fase asexual *Fusarium moniliforme*). Según los autores mencionados, las especies *F. moniliforme* y *F. verticillioides* son sinónimos y describen a esta especie, con la escasa presencia de macroconidios y que los microconidios se forman en monofiálides y que en ocasiones se observan fiálides en pares con apariencia de “orejas de conejo” o en forma de “V”, además

reportan la ausencia de clamidosporas y la presencia de células inflamadas que pudieran confundirse con clamidosporas.

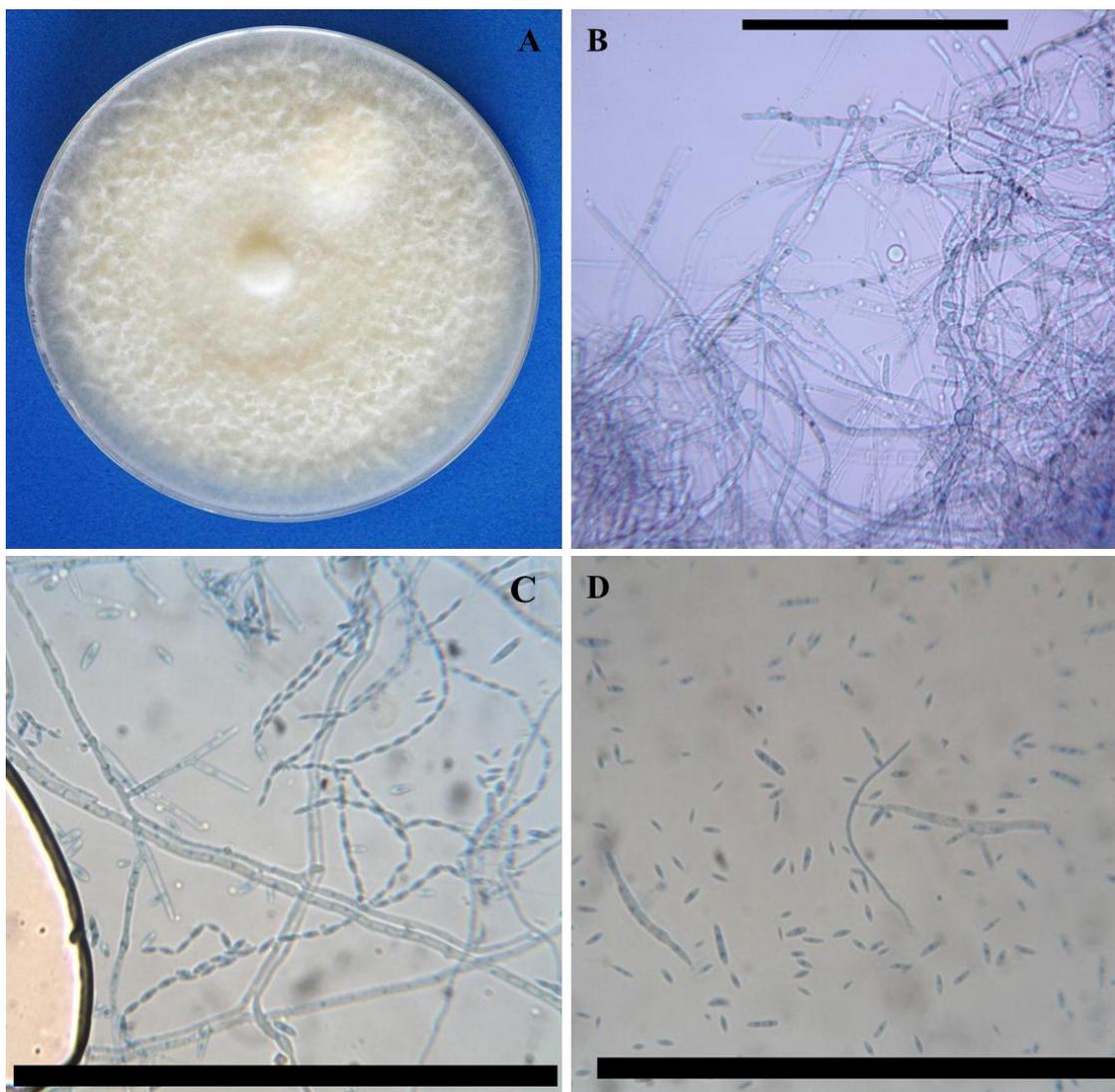


Figura 4.7 Cepa K8P [*Fusarium moniliforme* (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o *Giberella moniliformis*]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) fiálides y cadenas de microconidios. D) micro y macroconidios. Barras= 100 μ m.

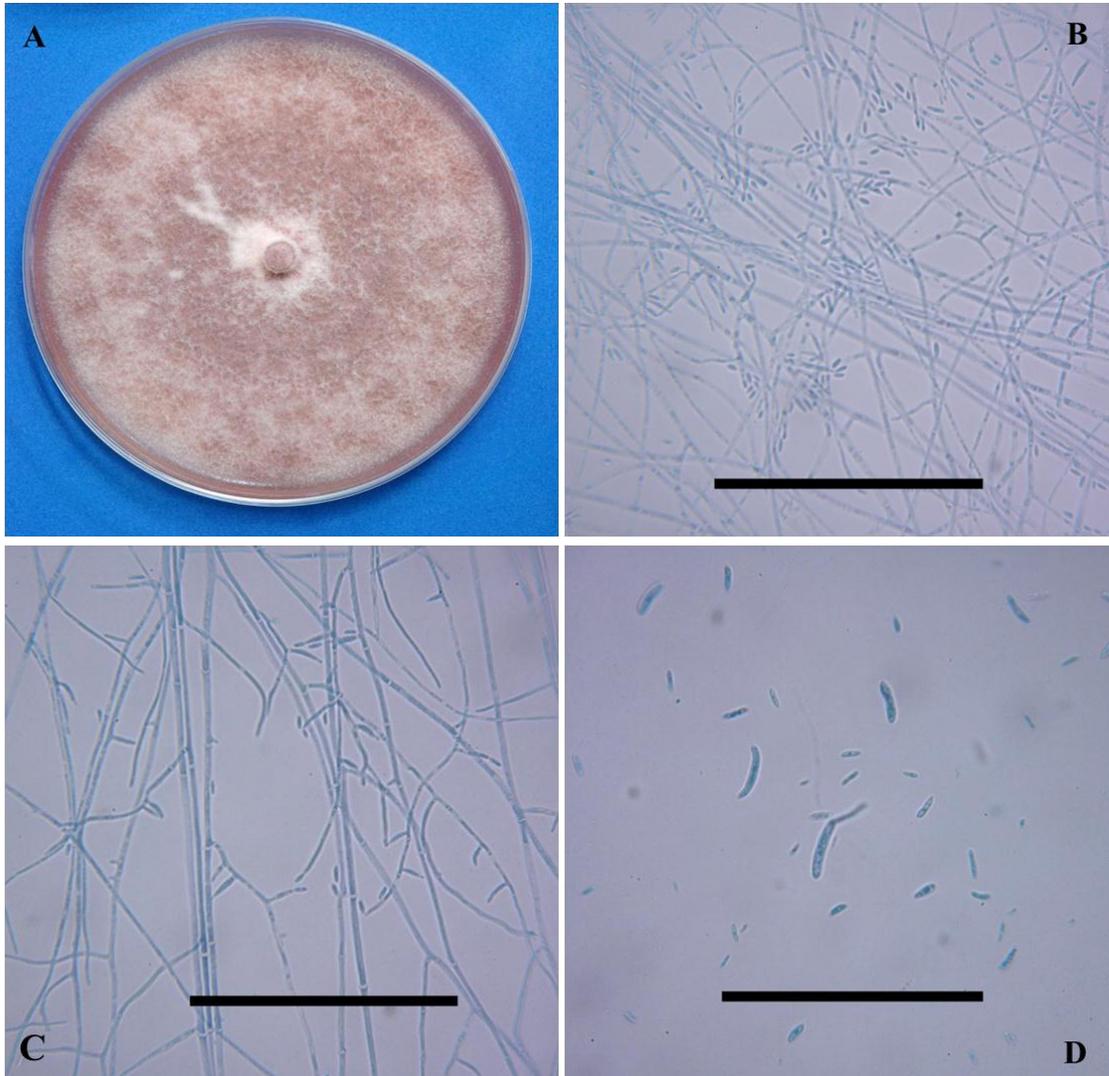


Figura 4.8 Cepas K12P [*Fusarium moniliforme* (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o *Giberella moniliformis*]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio y conidios. C) fiálides y micelio. D) microconidios. Barras= 100 μ m.

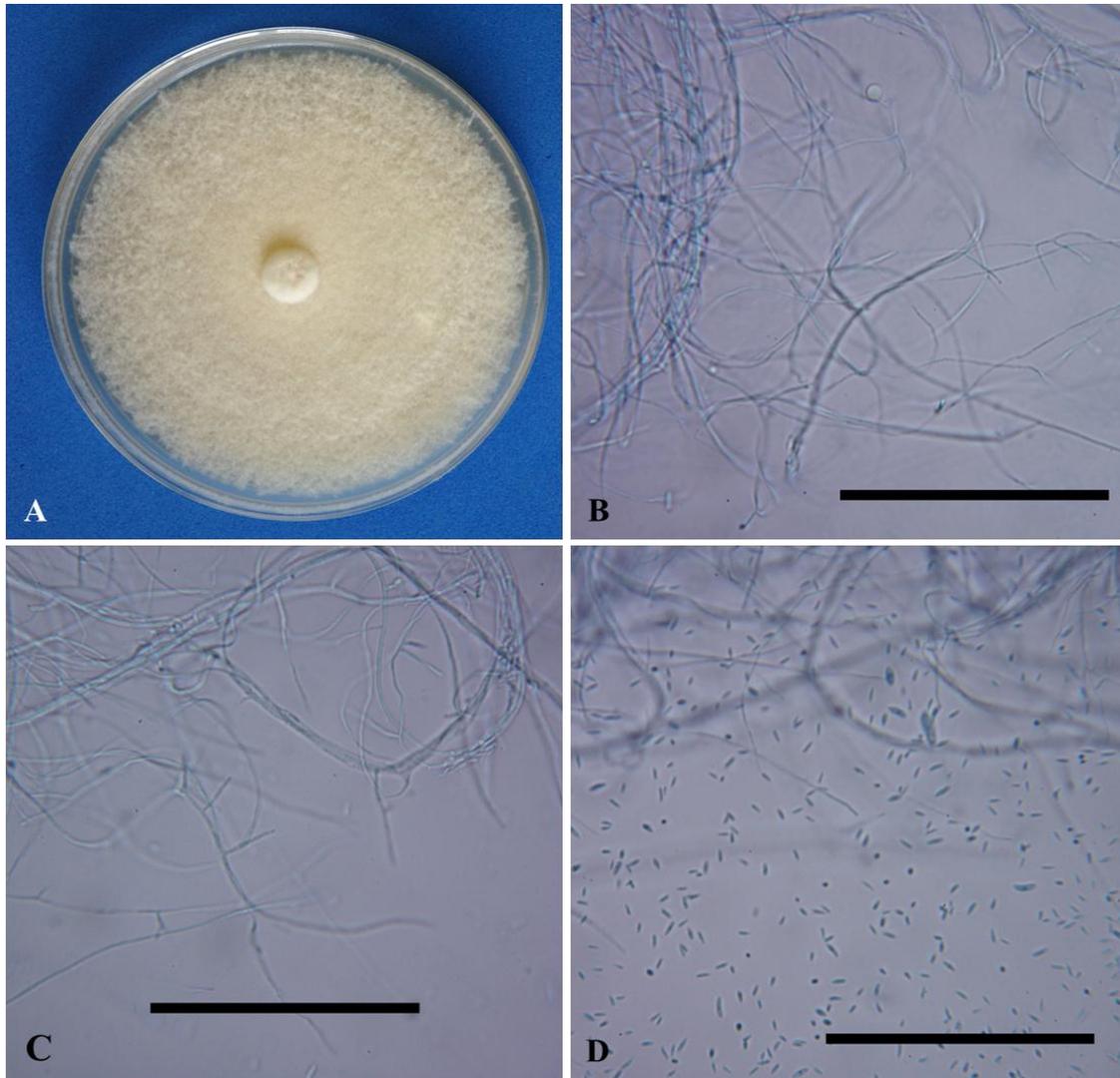


Figura 4.9 Cepa K3TP [*Fusarium moniliforme* (Sheldon) emend. Snyder & Hansen o *Giberella moniliformis*]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) fiálides. D) microconidios. Barras= 100 μm .

La cepa K14P presentó colonias con micelio algodonoso compacto, con desarrollo concéntrico, de color rosado en el centro y los bordes blancos (Figura 4.10A), la pigmentación vario de rosa claro a rosa oscuro con el tiempo. El grosor del micelio varió de entre 2.51 a 5.43 μm de ancho con presencia de polifiálides de 19.99 μm de largo por 3.22 μm de ancho en promedio (Figura 4.10 B). En ocasiones se observó engrosamiento del micelio aparentando la formación de clamidosporas, sin embargo, éstas no estuvieron presentes. Se observaron masas de

macroconidios en forma de canoa o casi rectos de entre 19.68 y 48.59 μm de largo y entre 2.28 y 4.3 μm de ancho (Figura 4.10C). Se encontraron microconidios en abundancia con formas ovaladas o elipsoides de 8.9 μm de largo por 3.07 μm de ancho en promedio (Figura 4.10D). Las características morfológicas descritas por Watanabe (2002) y la secuenciación molecular permitieron la identificación de la cepa K14P como *F. moniliforme*.

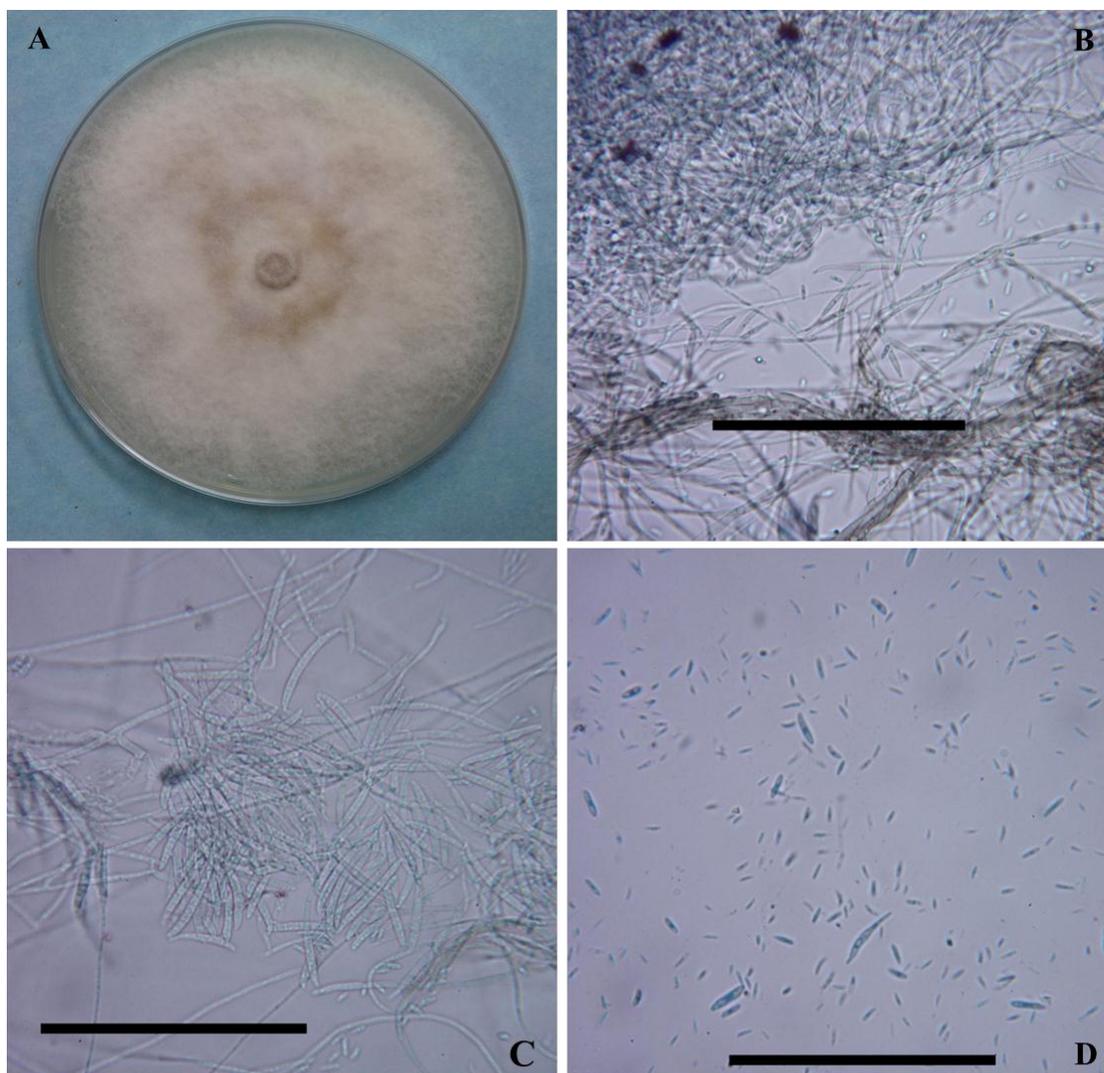


Figura 4.10 Cepa K14P [*Fusarium moniliforme* (Sheldon) emend. Snyder & Hansen]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio y polifialides. C) masas de macroconidios. D) microconidios. Barras= 100 μm

Las colonias de la cepa K8S presentaron micelio blanco aterciopelado lanoso color blanco con desarrollo concéntrico (Figura 4.11A), en el micelio profundo se observó pigmentación inicial beige tornándose a café oscuro con el tiempo. El micelio es septado con dimensiones de entre 1.77 y 4.36 μm de ancho (Figura 4.11B), las fiálides son ramificadas en el ápice y miden en promedio 13.48 μm de largo por 2.64 μm de ancho (Figura 4.11C). Se observaron conidios unicelulares subglobosos de entre 3.44 y 5.76 μm de largo y de 2.44 a 5.81 μm de ancho (Figura 4.11D). La secuencia molecular de la cepa K8S presentó afinidad a *Penicillium janthinellum* Biourg en un 99%. Las características macro y microscópicas encontradas en la cepa K8S coinciden con la descrita por Watanabe (2002) para esta especie, excepto las dimensiones de los conidios encontrados en K8S que son ligeramente más grandes.

En la figura 4.12A se observan las características macroscópicas de la cepa K14S, ésta presenta micelio algodonoso laxo color verde-gris, con desarrollo concéntrico y abundante; el micelio profundo mostró pigmentos café grisáceo al inicio tornándose café oscuro a negro con el tiempo. El micelio es hialino sin septos de entre 3.62 y 17.2 μm de ancho (Figura 4.12B), se observaron esporangióforos ramificados y hialinos con dimensiones muy variables, que fueron desde 11.67 μm de largo por 4.44 μm de ancho hasta 111.4 μm de largo por 12.79 μm de ancho (Figura 4.12B). Los esporangios son terminales, color café claro de 17.19 μm de largo por 19.2 μm ancho en promedio, tienen columela con collar (Figura 4.12B).

La columela es hialina globosa o subglobosa de 10.38 μm de largo por 11.99 μm de ancho en promedio, las esporangiosporas son unicelulares, globosas, subglobosas u ovoides de color café claro de 6.99 μm de largo por 4.64 μm de ancho (Figura 4.12C). Se observaron clamidosporas en buen número, éstas son de color café claro a oscuro con doble pared y midieron en promedio 20.25 de largo por 15.6 de ancho (Figura 4.12D). Las características macro y microscópicas

observadas en ésta cepa coinciden con las descritas por Watanabe (2002) para *Mucor circinelloides* van Tieghem, además la secuencia molecular indicó similitud con esta especie en un 98%.

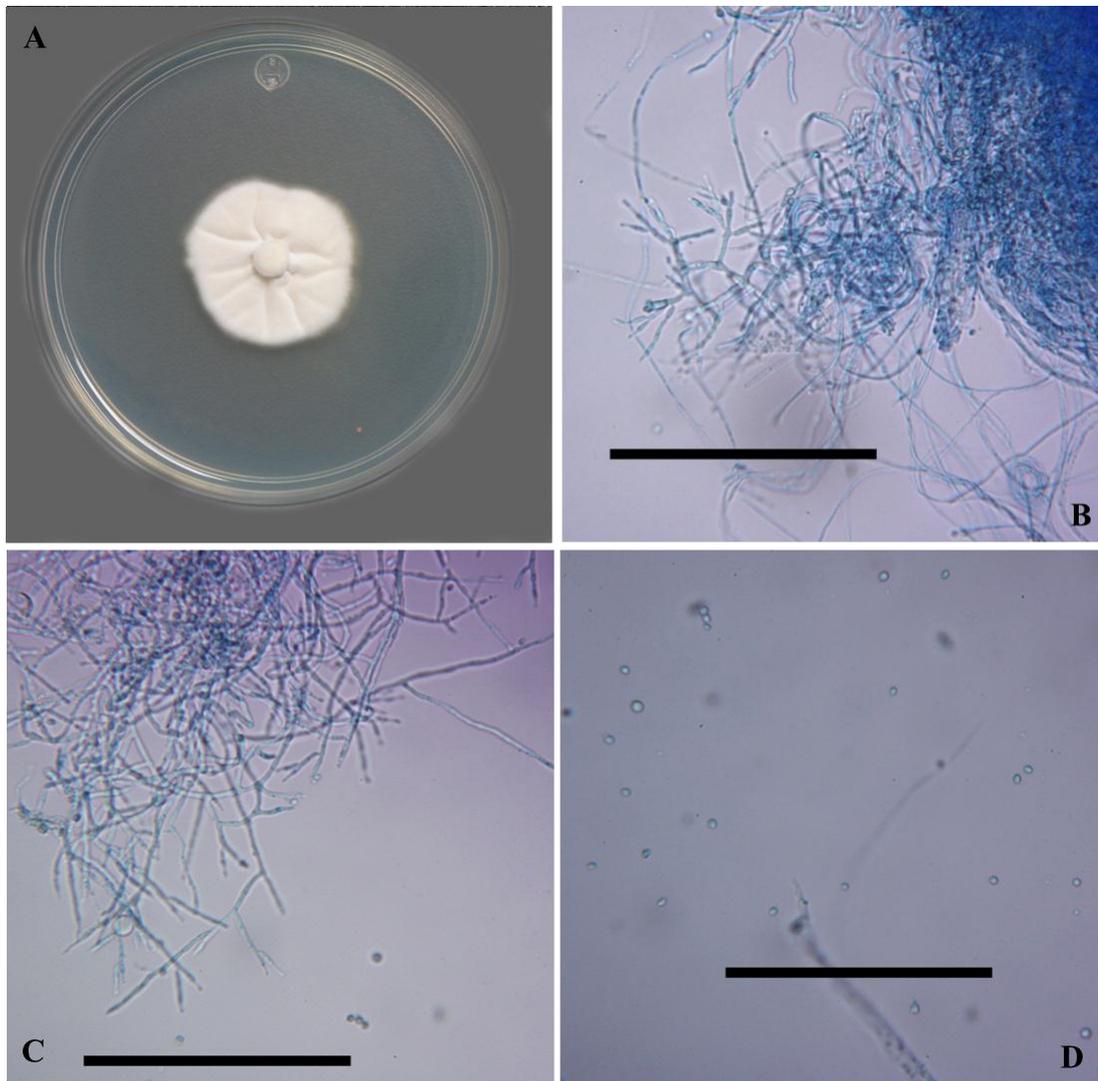


Figura 4.11 Cepa K8S (*Penicillium janthinellum* Biourge). A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) micelio y fiálides. D) conidios. Barras= 100 μ m

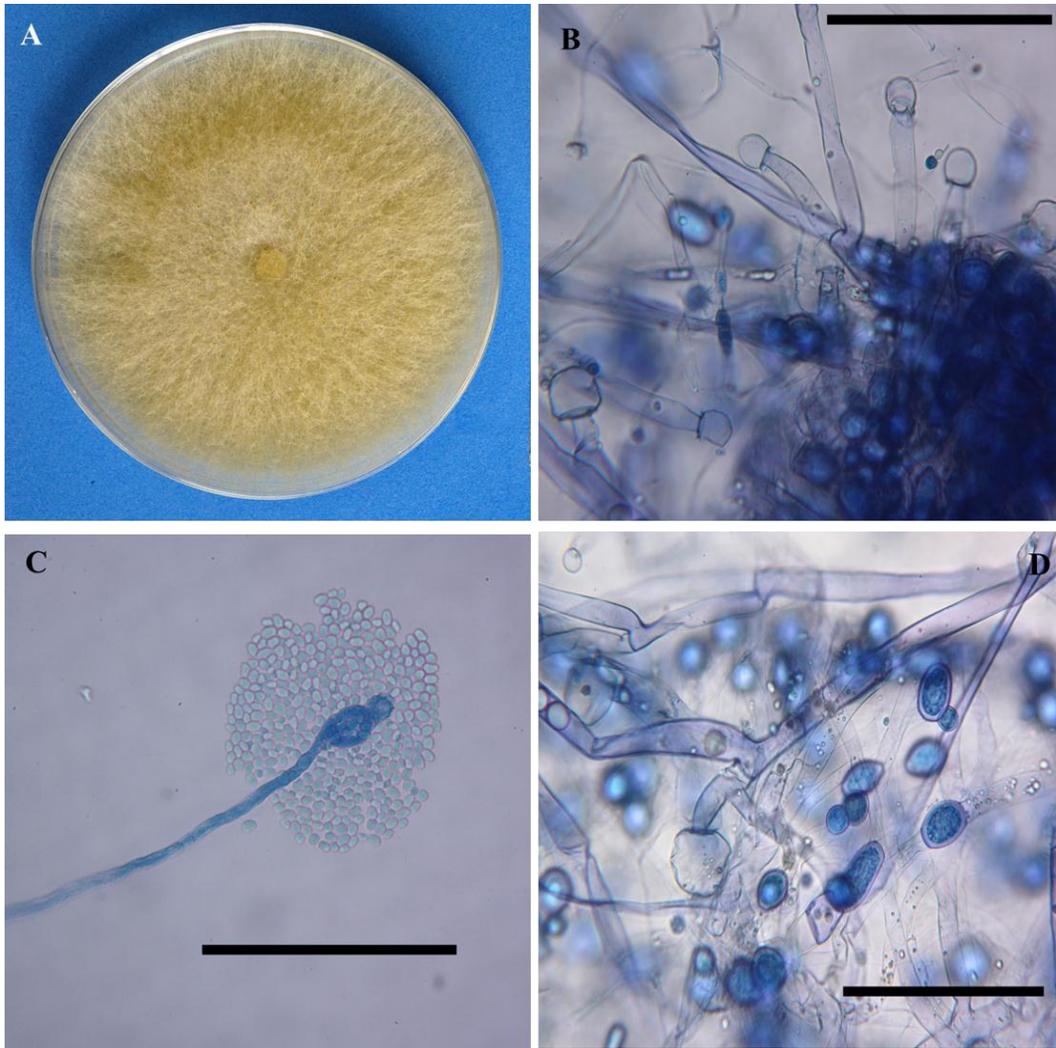


Figura 4.12 Cepa K14S (*Mucor circinelloides* van Tieghem). A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio, esporangióforos y esporangios con collar. C) columela y esporangiosporas. D) micelio y clamidosporas. Barras= 100 μ m

Las características macroscópicas de la cepa K11TP muestran desarrollo micelial concéntrico con micelio aterciopelado compacto, con micelio color verde-café que no sobrepasa mucho el nivel del agar, con el tiempo la colonia se torna verde oscuro a negro con micelio grisáceo en la superficie (Figura 4.13A). El micelio es septado de entre 3.01 y 8.73 μ m de ancho, los conidióforos midieron en promedio 58.86 μ m de largo por 4.83 μ m de ancho (Figura 4.13B). Se observaron conidios alargados, ovalados, elipsoides o subesferoidales de entre 9.62 y 36.94 μ m

de largo por 9 μm de ancho con dos a cuatro septos transversales al inicio y uno o dos septos longitudinales en conidios más maduros, los conidios son verde olivo o café verdoso y se encontraron en cadenas cortas (Figura 4.13C y D), las características macro y microscópicas observadas en esta cepa coinciden con a las descritas por Watanabe (2002) y Simmons (2007) para la especie *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, además la identificación molecular indicó similitud en un 98% con esta especie.

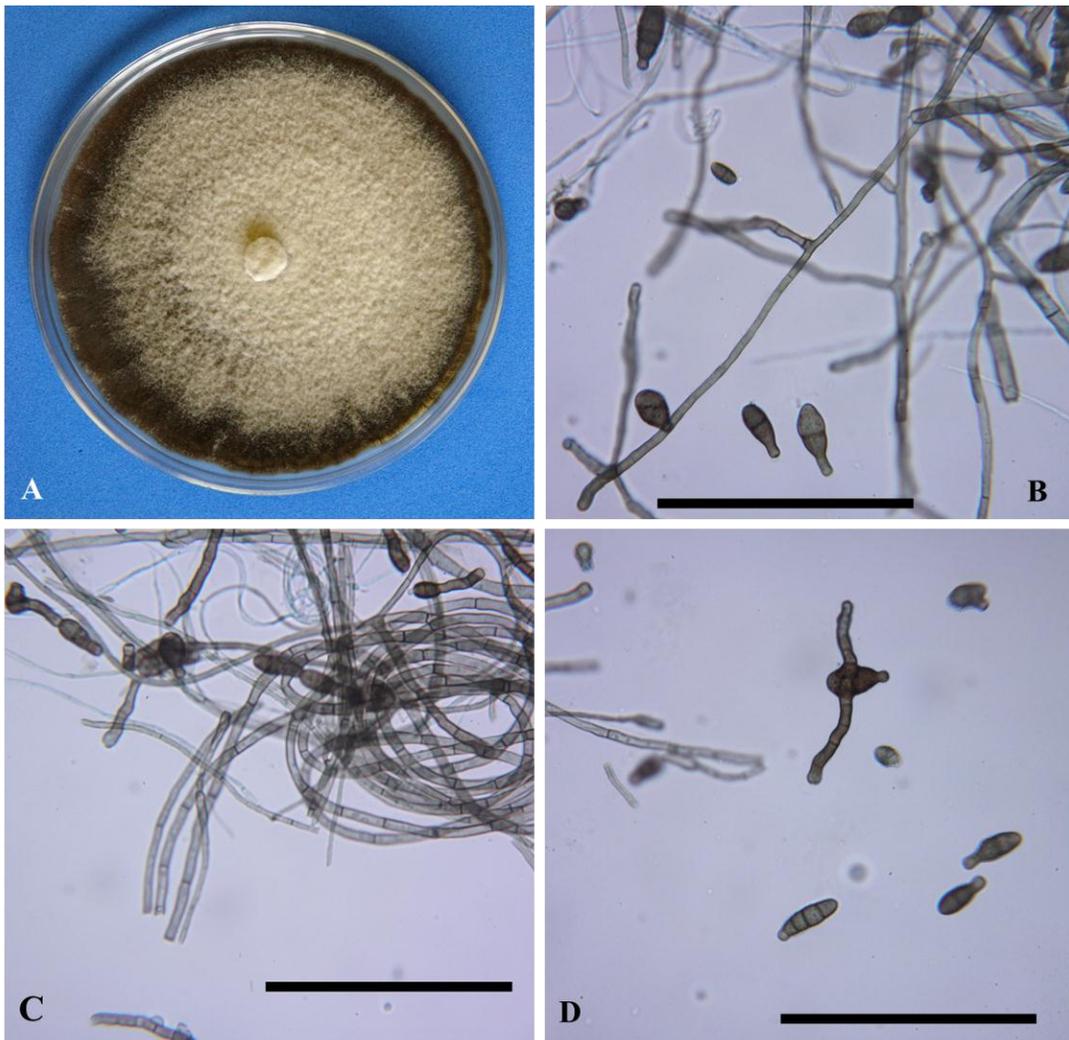


Figura 4.13 Cepa K3TP [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler]. A) aspecto de la colonia en medio PDA. B) micelio. C) micelio y conidio. D) conidios. Barras= 100 μm

4.3.3 Pruebas de patogenicidad

Debido a que varias de las cepas pertenecen a géneros de hongos fitopatógenos, se realizaron pruebas para verificar su patogenicidad en plántulas de jitomate variedad Rio Grande y Rio Colorado (Figura 4.14), y en plántulas de trigo (Figura 4.15) en condiciones de invernadero. Se observaron algunas plantas muertas durante los 29 días de bioensayo, una en el tratamiento con la cepa K13P de la variedad Rio Grande, una en el testigo y una en el tratamiento con la cepa K9P de la variedad Rio Colorado; sin embargo, no se presentaron signos de enfermedad en ninguno de los casos (Figura 4.14D) y al parecer fueron el producto del daño mecánico durante el manejo (Cuadro 4.2). Al final del bioensayo (40 días) se retiró el sustrato de las raíces para observar la posible presencia de los hongos en la raíz (Figura 4.14C) y no se encontraron síntomas ni daño por la inoculación de las cepas en ninguna de las plantas. En este caso la prueba fue negativa a la patogenicidad de las cepas probadas en jitomate.

En la prueba de patogenicidad realizada con plántulas de trigo no se encontraron plantas muertas en ninguno de los tratamientos (Cuadro 4.3; Figura 4.15C). Varias plantas se vieron afectadas por las altas temperaturas en el invernadero incluídas algunas de los testigos presentando una ligera clorosis en los ápices de las hojas, pero en ningún caso se presentaron síntomas de enfermedad durante los 17 días de la prueba. Al revisar las raíces de las plantas inoculadas con las cepas en estudio, ninguna planta presentó daño o síntomas por enfermedad (Figura 4.15D y E) indicando que la prueba de patogenicidad en trigo fue negativa.

Cuadro 4.2. Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas y tres cepas de referencia a 40 días de inoculadas en dos variedades de jitomate.

Cepa	Especie	Rio Grande				Rio Colorado			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
TA	Testigo	-	-	-	-	-	X	-	-
PC	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
TRI	<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
TV	<i>Trametes versicolor</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K1P	<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K2P	<i>F. succisae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K8P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K9P	<i>F. proliferatum</i>	-	-	-	-	-	-	X	-
K12P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K13P	<i>F. succisae</i>	-	-	-	X	-	-	-	-
K14P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K1S	<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K8S	<i>Penicillium janthinellum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K11S	<i>F. equiseti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K14S	<i>Mucor circinelloides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K3TP	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
K11TP	<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

X= Una planta muerta, “-” = negativo a signos o síntomas por enfermedad.

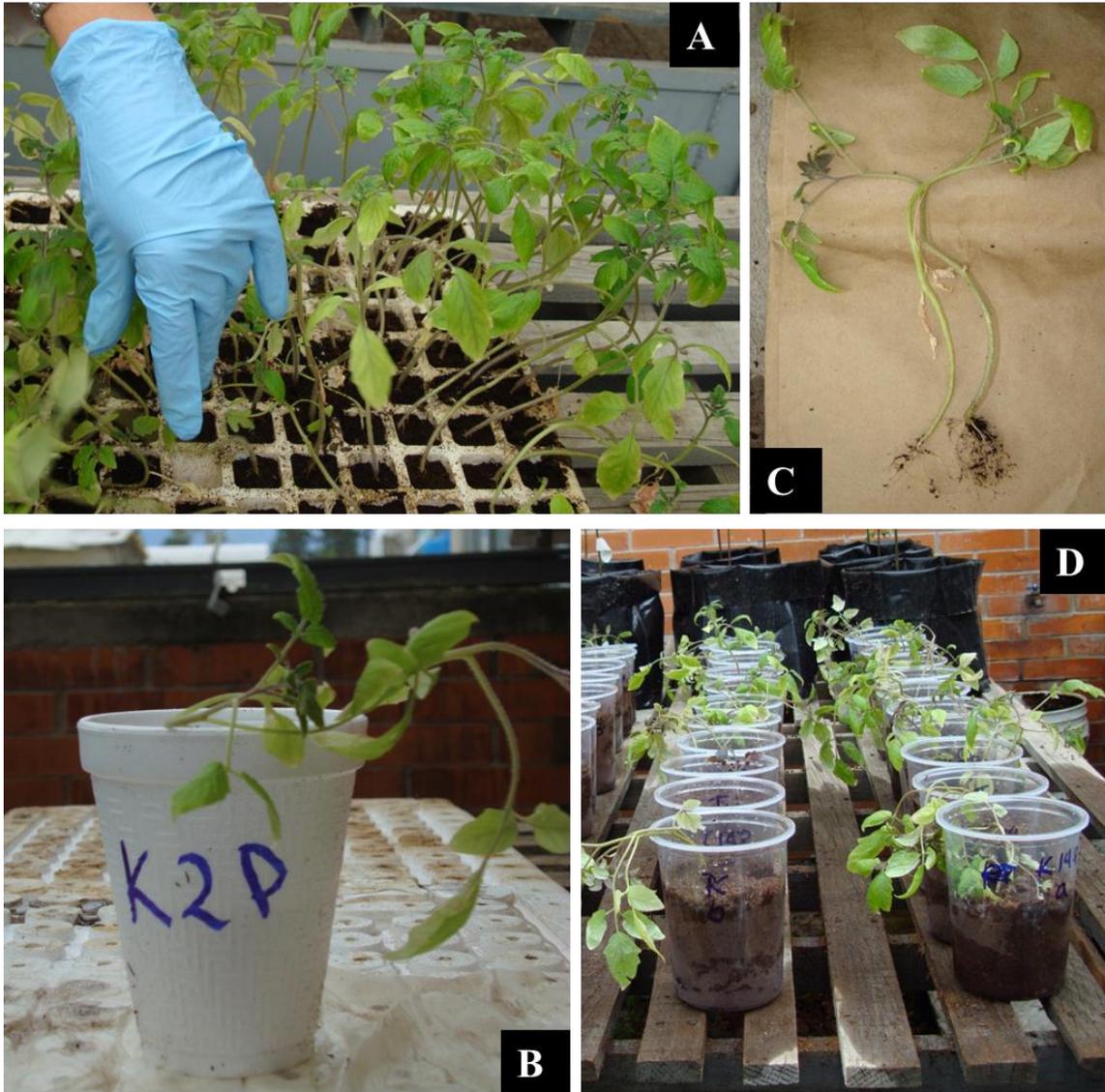


Figura 4.14 Pruebas de patogenicidad en invernadero con plántulas de jitomate. A) Desarrollo en charola de germinación variedad Río Grande, B) Inoculación con solución de esporas. C) Planta de jitomate variedad Río Grande a los 40 días de inoculada, sin daño en raíz. D) Plantas de jitomate variedad Río Grande a 35 días de la inoculación con las cepas fúngicas.

Cuadro 4.3. Pruebas de patogenicidad de las cepas aisladas y tres cepas de referencia inoculadas en plántulas de trigo

Cepa	Especie	Trigo				
		R1	R2	R3	R4	R5
TA	Testigo	-	-	-	-	-
PC	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	-	-	-	-	-
TRI	<i>Trichoderma koningii</i>	-	-	-	-	-
TV	<i>Trametes versicolor</i>	-	-	-	-	-
K1P	<i>Fusarium proliferatum</i>	-	-	-	-	-
K2P	<i>F. succisae</i>	-	-	-	-	-
K8P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-
K9P	<i>F. proliferatum</i>	-	-	-	-	-
K12P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-
K13P	<i>F. succisae</i>	-	-	-	-	-
K14P	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-
K1S	<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-	-
K8S	<i>Penicillium janthinellum</i>	-	-	-	-	-
K11S	<i>F. equiseti</i>	-	-	-	-	-
K14S	<i>Mucor circinelloides</i>	-	-	-	-	-
K3TP	<i>F. moniliforme</i>	-	-	-	-	-
K11TP	<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-	-

“-” = negativo a signos o síntomas por enfermedad.

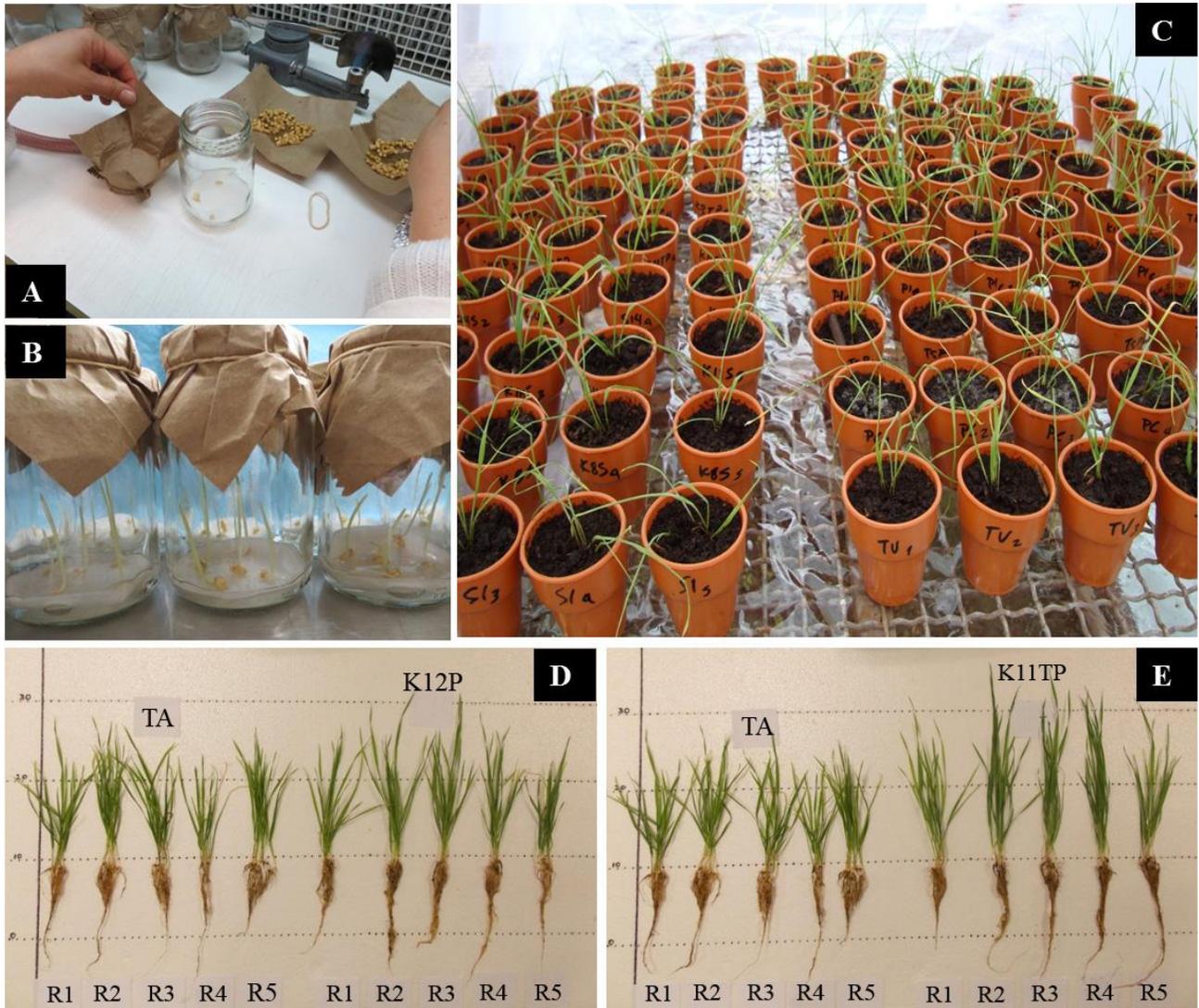


Figura 4.15 Pruebas de patogenicidad de cepas fúngicas en plantas de trigo en condiciones de invernadero. A) siembra en condiciones de esterilidad. B) germinación de la semilla. C) Plantas de trigo a 10 días de inoculadas. D) raíces de plantas de trigo a los 17 días de inoculadas con una concentración de $3.0 \times 10^6 \pm 0.5$ esporas mL^{-1} de *Fusarium moniliforme* (K12P), las cuáles no presentan daño ni síntomas de enfermedad, comparación con el testigo. E) raíces de plantas de trigo a los 17 días de la inoculación con una concentración de $3.0 \times 10^6 \pm 0.5$ esporas mL^{-1} de *Alternaria alternata* (K11TP), no presentan daño ni síntomas de enfermedad, comparación con el testigo.

4.3.4 Preselección de cepas tolerantes a endosulfán

Con base en los valores de la tasa máxima de crecimiento y la escala de velocidad de crecimiento preestablecida, en el testigo absoluto (TA), las cepas con desarrollo micelial (DM) acelerado fueron las cepas TRI, PC y K14S con 40.6, 24.1 y 20 mmd^{-1} , respectivamente (Cuadro 4.4). La cepa TV (19.5 mm d^{-1}) y los aislamientos provenientes de paja de trigo molida (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P, y K14P) mostraron DM medio, mientras que las cepas K1S, K8S, K11S, K3TP y K11TP tuvieron un desarrollo lento con valores de entre 2.92 y 6.86 mm d^{-1} (Cuadro 4.4).

Las cepas con desarrollo acelerado como TRI y K14S mostraron un decremento marcado en las tasas máximas de crecimiento (T_{max}) en presencia del insecticida, casi en un 50% (Cuadro 4.4). La cepa PC no presentó reducciones tan drásticas como TRI y K14S, a pesar de la disminución en las T_{max} estas cepas se recuperaron totalmente a los 18 días (Figuras 4.17 y 4.18). Las cepas con desarrollo mediano también mostraron reducción en los valores de T_{max} de casi 50% con excepción de las cepas TV y K8S cuyos valores de T_{max} en los tratamientos con EN no fueron significativamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$) con respecto a la tasa máxima obtenida para el TA. En contraste, las T_{max} de las cepas con desarrollo lento no presentaron diferencias significativas entre los valores de T_{max} de los tratamientos con EN y el TA (Cuadro 4.4).

El número de días en que las cepas alcanzaron el 95% del crecimiento máximo ($D_{95\% \text{ cmax}}$) disminuyó cuando las T_{max} incrementaron. Las cepas con desarrollo acelerado y valores de T_{max} altas como TRI y PC alcanzaron el máximo desarrollo entre los 3.2 y 8.3 días incluso en presencia del EN, mientras que la cepa K14S ante 250 mg EN L^{-1} retrasó su desarrollo hasta 19.7 días (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4 Tasa máxima de crecimiento (T_{max}) y día en que se alcanzó el 95% de crecimiento máximo ($D95\%_{Cmax}$) de hongos filamentosos y cepas de referencia, después de la exposición ante tres dosis de endosulfán (EN) durante 18 días.

Cepa	Trat. (mg L ⁻¹)	$T_{max} \pm SE$ (mm d ⁻¹)	$D95\%_{Cmax} \pm SE$ (días)	Cepa	Trat.	$T_{max} \pm SE$ (mm d ⁻¹)	$D95\%_{Cmax} \pm SE$ (días)
K1P	TA	16.9 ± 1.5 a	7.4 ± 3.8 a	K8S	TA	6.86 ± 1.06 a	17.77 ± 4.3 a
	Ac	14.7 ± 1.5 a	9.3 ± 3.8 a		Ac	4.56 ± 1.06 a	26.81 ± 4.3 a
	250	5.1 ± 1.5 b	32.8 ± 3.8 b		250	5.16 ± 1.06 a	27.58 ± 4.3 a
	500	2.9 ± 1.5 b	37.4 ± 3.8 b		500	4.71 ± 1.06 a	27.53 ± 4.3 a
	1000	2.4 ± 1.5 b	27.4 ± 3.8 ab		1000	5.09 ± 1.06 a	26.29 ± 4.3 a
K2P	TA	15.8 ± 1.5 a	7.5 ± 3.8 a	K11S	TA	4.40 ± 1.06 a	28.78 ± 4.4 a
	Ac	6.9 ± 1.5 b	21.3 ± 3.8 b		Ac	2.73 ± 1.3 a	18.28 ± 5.4 a
	250	6.5 ± 1.5 b	22.6 ± 3.8 b		250	3.34 ± 1.3 a	32.13 ± 5.4 ab
	500	4.9 ± 1.5 b	34.0 ± 3.8 bc		500	3.97 ± 1.3 a	30.29 ± 5.4 ab
	1000	4.1 ± 1.5 b	30.5 ± 3.8 bc		1000	3.03 ± 1.3 a	22.83 ± 5.4 ab
K8P	TA	16.8 ± 1.5 a	7.2 ± 3.8 a	K14S	TA	20 ± 1.06 a	5.03 ± 4.4 a
	Ac	13.0 ± 1.5 a	14.1 ± 3.8 ac		Ac	20.2 ± 1.06 a	13.53 ± 4.4 a
	250	6.5 ± 1.5 ab	23.0 ± 3.8 ac		250	8.48 ± 1.06 b	19.68 ± 4.4 b
	500	4.3 ± 1.5 b	31.6 ± 3.8 bc		500	6.78 ± 1.06 b	14.11 ± 4.4 a
	1000	3.9 ± 1.5 b	30.2 ± 3.8 bc		1000	8.34 ± 1.06 b	11.87 ± 4.4 b
K9P	TA	15.6 ± 1.5 a	8.9 ± 3.8 a	K3TP	TA	4.0 ± 1.06 a	23.8 ± 4.4 a
	Ac	9.2 ± 1.5 b	23.6 ± 3.8 ac		Ac	3.06 ± 1.06 a	22.93 ± 4.4 a
	250	5.5 ± 1.5 b	31.9 ± 3.8 bcd		250	2.87 ± 1.06 a	26.2 ± 4.4 a
	500	4.2 ± 1.5 b	48.1 ± 3.8 bd		500	2.63 ± 1.06 a	29.6 ± 4.4 a
	1000	2.6 ± 1.5 b	47.5 ± 3.8 bd		1000	3.01 ± 1.03 a	18.19 ± 4.4 a
K12P	TA	16.8 ± 1.5 a	7.9 ± 3.8 a	K11TP	TA	5.15 ± 1.06 b	33.99 ± 4.4 b
	Ac	8.8 ± 1.5 b	16.4 ± 3.8 ac		Ac	8.5 ± 1.06 a	14.89 ± 4.4 a
	250	9.2 ± 1.5 b	13.4 ± 3.8 a		250	9.9 ± 1.06 a	13.26 ± 4.4 a
	500	4.9 ± 1.5 b	31.6 ± 3.8 bc		500	9.5 ± 1.06 a	13.25 ± 4.4 a
	1000	4.4 ± 1.5 b	35.6 ± 3.8 b		1000	3.02 ± 1.06 b	42.69 ± 4.4 b
K13P	TA	18.1 ± 1.5 a	6.2 ± 3.8 a	PC	TA	24.1 ± 1.5 a	4.6 ± 3.8 a
	Ac	14.1 ± 1.5 abc	10.9 ± 3.8 a		Ac	23.2 ± 1.5 a	5.0 ± 3.8 a
	250	5.3 ± 1.5 bc	29.7 ± 3.8 bc		250	22.8 ± 1.5 a	5.0 ± 3.8 a
	500	4.8 ± 1.5 c	37.3 ± 3.8 b		500	18.3 ± 1.5 a	6.9 ± 3.8 a
	1000	5.4 ± 1.5 cd	16.1 ± 3.8 ac		1000	18.2 ± 1.5 a	7.9 ± 3.8 a
K14P	TA	16.7 ± 1.5 a	7.4 ± 3.8 a	TV	TA	19.5 ± 1.5 a	6.7 ± 3.8 a
	Ac	5.9 ± 1.5 b	25.3 ± 3.8 ac		Ac	15.7 ± 1.5 a	9.7 ± 3.8 a
	250	7.6 ± 1.5 b	15.7 ± 3.8 ac		250	16.8 ± 1.5 a	7.8 ± 3.8 a
	500	6.0 ± 1. b	23.4 ± 3.8 ac		500	14.9 ± 1.5 a	8.7 ± 3.8 a
	1000	5.2 ± 1.5 b	33.0 ± 3.8 bc		1000	10.0 ± 1.5 b	12.9 ± 3.8 a
K1S	TA	2.92 ± 1.0 a	18.68 ± 4.4 a	TRI	TA	40.6 ± 1.5 a	3.2 ± 3.8 a
	Ac	2.62 ± 1.3 a	19.27 ± 4.4 a		Ac	20.4 ± 1.5 b	7.1 ± 3.8 a
	250	2.31 ± 1.3 a	22.98 ± 4.4 a		250	16.2 ± 1.5 b	8.3 ± 3.8 a
	500	2.36 ± 1.3 a	19.85 ± 4.4 a		500	17.1 ± 1.5 b	7.2 ± 3.8 a
	1000	2.5 ± 1.3 a	22.65 ± 4.4 a		1000	18.3 ± 1.5 b	6.6 ± 3.8 a

Trat.= tratamiento para cada especie, SE= Error estándar de la media. En cada columna y para cada cepa, los tratamientos marcados con diferente letra son significativamente diferentes entre sí (Tukey, $\alpha= 0.05$)

En el caso de las cepas con desarrollo mediano los valores de $D95\%_{cmax}$ fluctuaron entre 13.4 y hasta 48 días, estos valores no difirieron mucho con respecto a los valores de $D95\%_{cmax}$ de las cepas con desarrollo lento (13.2 a 42.7 días) (Cuadro 4.4). A diferencia del resto de las cepas con desarrollo mediano, los valores de $D95\%_{cmax}$ de la cepa TV no incrementaron por lo que alcanzaron el crecimiento máximo entre 6.7 y 12.9 días, incluso en presencia del insecticida (Cuadro 4.4). La variación en el DM de los hongos filamentosos en medio paja-agar con o sin contaminante ha sido reportado por Matsubara *et al.* (2006) quienes documentan un desarrollo acelerado de *Trichoderma harzianum*, y desarrollo mediano de *Coriolus versicolor* (o *Trametes versicolor*) al igual que lo encontrado en este bioensayo.

En la mayoría de los casos, el solvente acetona (Ac) provocó disminución en las T_{max} hasta en un 50%, con excepción de las cepas PC, K14S y K1P, y en menor grado las cepas TV, K8P y K13P (Cuadro 4.4). No obstante, todas las cepas se recuperaron gradualmente a lo largo del bioensayo (Figuras 4.16, 4.17 y 4.18).

En congruencia con los valores de T_{max} y $D95\%_{cmax}$, las cepas de referencia TRI, PC y TV mostraron las mejores dinámicas de desarrollo y recuperación del desarrollo ante la presencia de las diferentes dosis de EN. La cepa PC cubrió la totalidad de la caja (83 mm) a los seis días en el TA, y la presencia del solvente y el EN afectaron el DM; sin embargo, ésta se recuperó en su totalidad a los 8 días (Figura 4.18). En el caso de la cepa TRI, en ausencia del contaminante cubrió el total de la superficie de agar a los cuatro días, y la presencia del insecticida y el solvente retrasaron el DM pero su recuperación total se dio a los 10 días (Figura 4.18). Las cepas K14S y TV alcanzaron los 83 mm de diámetro a los 6 y 7 días, respectivamente, en ausencia del plaguicida. Sin embargo, el DM se vio afectado en mayor medida que PC y TRI y la recuperación

total de estas cepas ocurrió hasta los 16 y 18 días, respectivamente (Figuras 4.17 y 4.18). Cabe resaltar que el tratamiento con acetona afectó en mayor medida a la cepa TV en comparación con 250 y 500 mg de EN L⁻¹ mientras que la cepa K14S no se vio afectada por el solvente.

Por su parte las cepas K8S y K11TP presentaron dinámicas de desarrollo más lentas que PC, TRI, TV y K14S. La cepa K8S alcanzó los 83 mm hasta los 18 días y K11TP presentó no más de 50 mm, estas cepas también se vieron afectadas en el desarrollo por la presencia del plaguicida, con recuperación al final del bioensayo, incluso la cepa K11TP presentó mayor DM (83 mm) ante 250 y 500 mg de EN L⁻¹ y el solvente acetona que en el TA (Figura 4.18).

En ausencia del insecticida EN, las cepas provenientes de paja molida de trigo (K1P, K2P, K8P, K9P, K12P, K13P y K14P) alcanzaron a cubrir la caja entre los 6 y 12 días después de la inoculación, en cada cepa, el DM se vio afectado en diferentes grados por el plaguicida. Las cepas K2P, K12P y K14P en comparación con el resto de las cepas provenientes de este sustrato, presentaron recuperación al final del bioensayo (18 días), incluso presentaron recuperación total ante 250 mg L⁻¹ de EN (Figuras 4.16; 4.17).

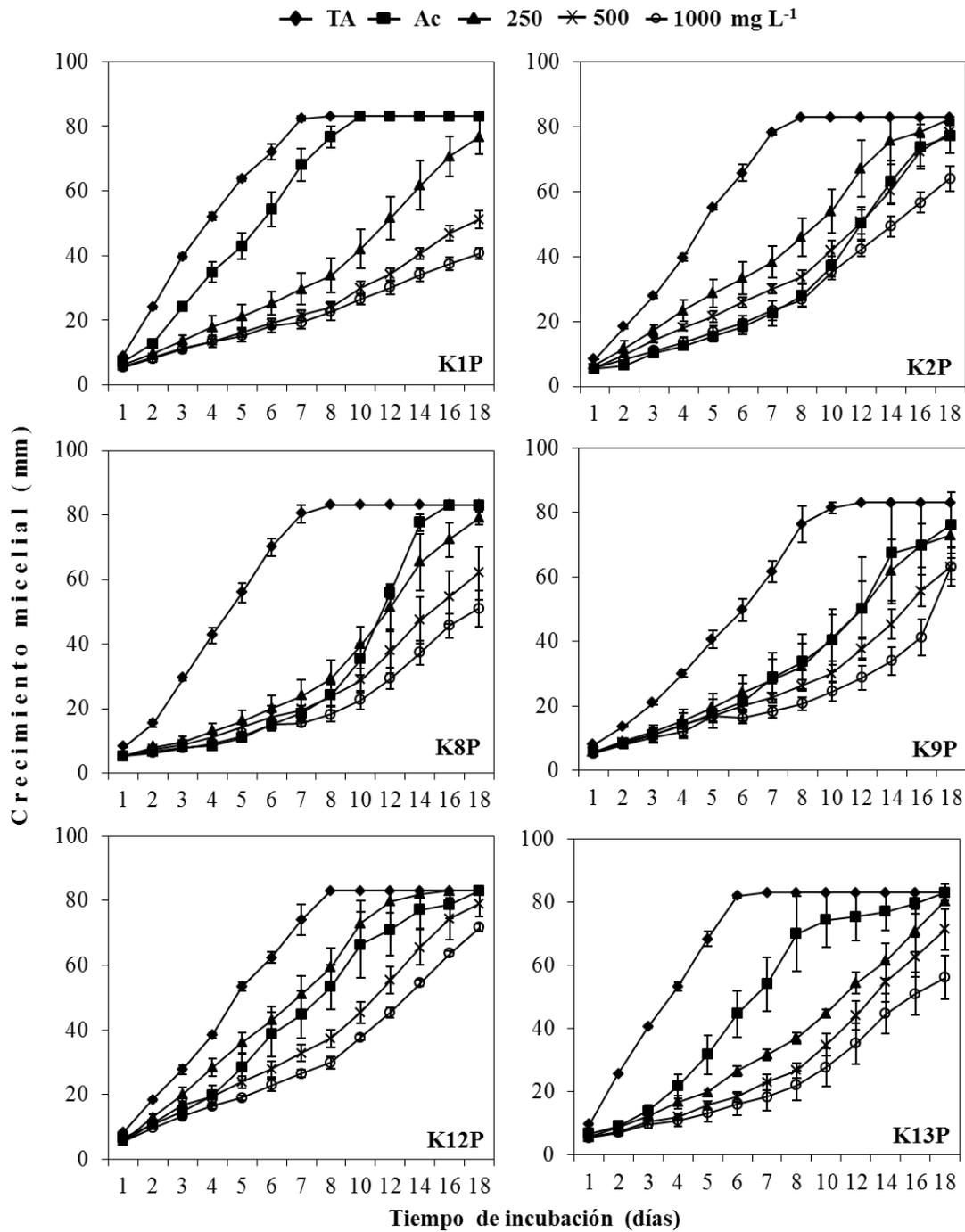


Figura 4.16 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo, expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis de endosulfán (mg L⁻¹). Simbología: K1P= *Fusarium proliferatum*, K2P= *F. succisae*, K8P= *F. moniliforme*, K9P= *F. proliferatum*, K12P= *F. moniliforme*, K13P= *F. succisae*, TA= Testigo absoluto, Ac= Testigo acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

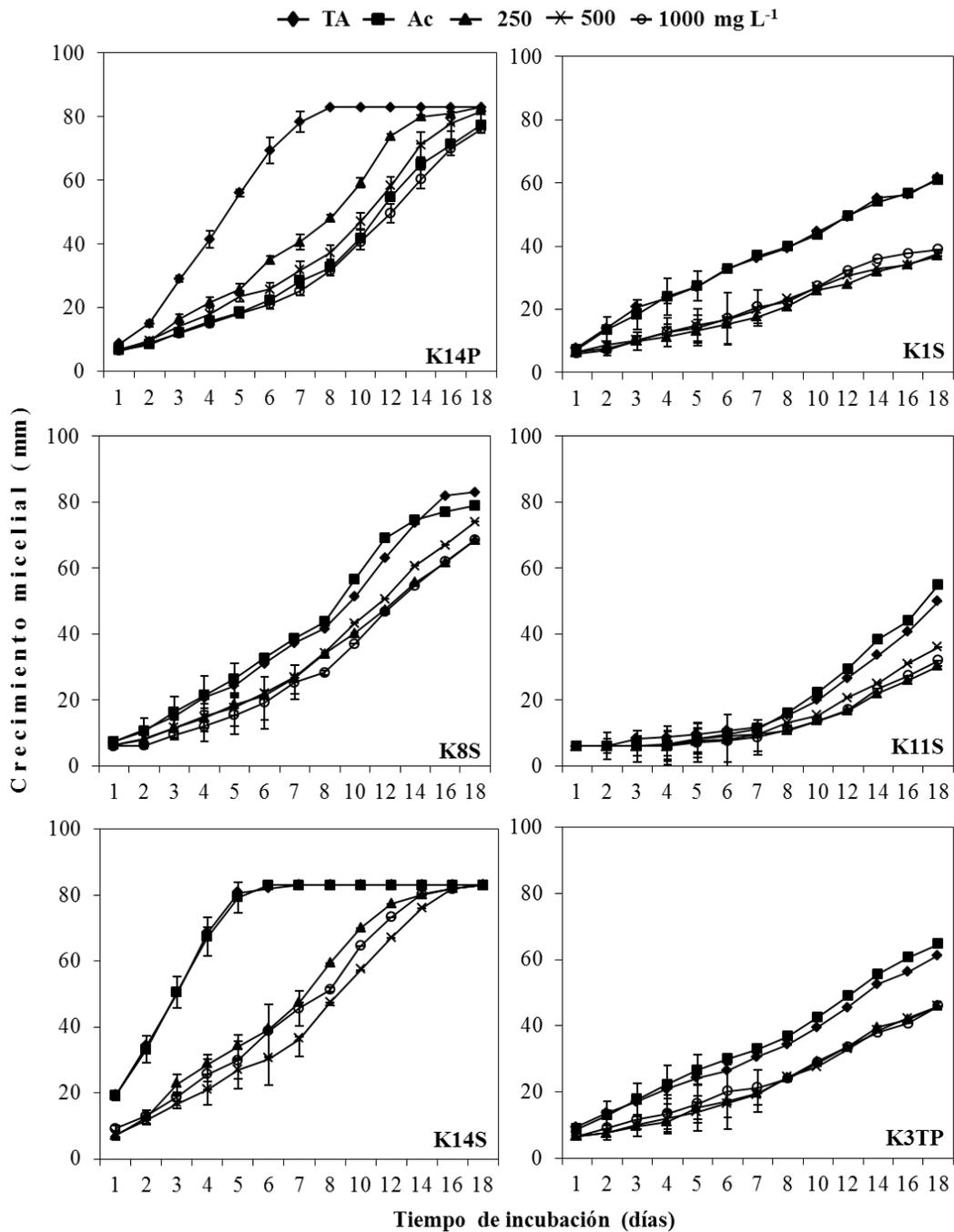


Figura 4.17 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis de endosulfán (mg L⁻¹). Simbología: K14P= *Fusarium moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K11S= *F. equiseti*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme* TA= Testigo absoluto, Ac= Testigo acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

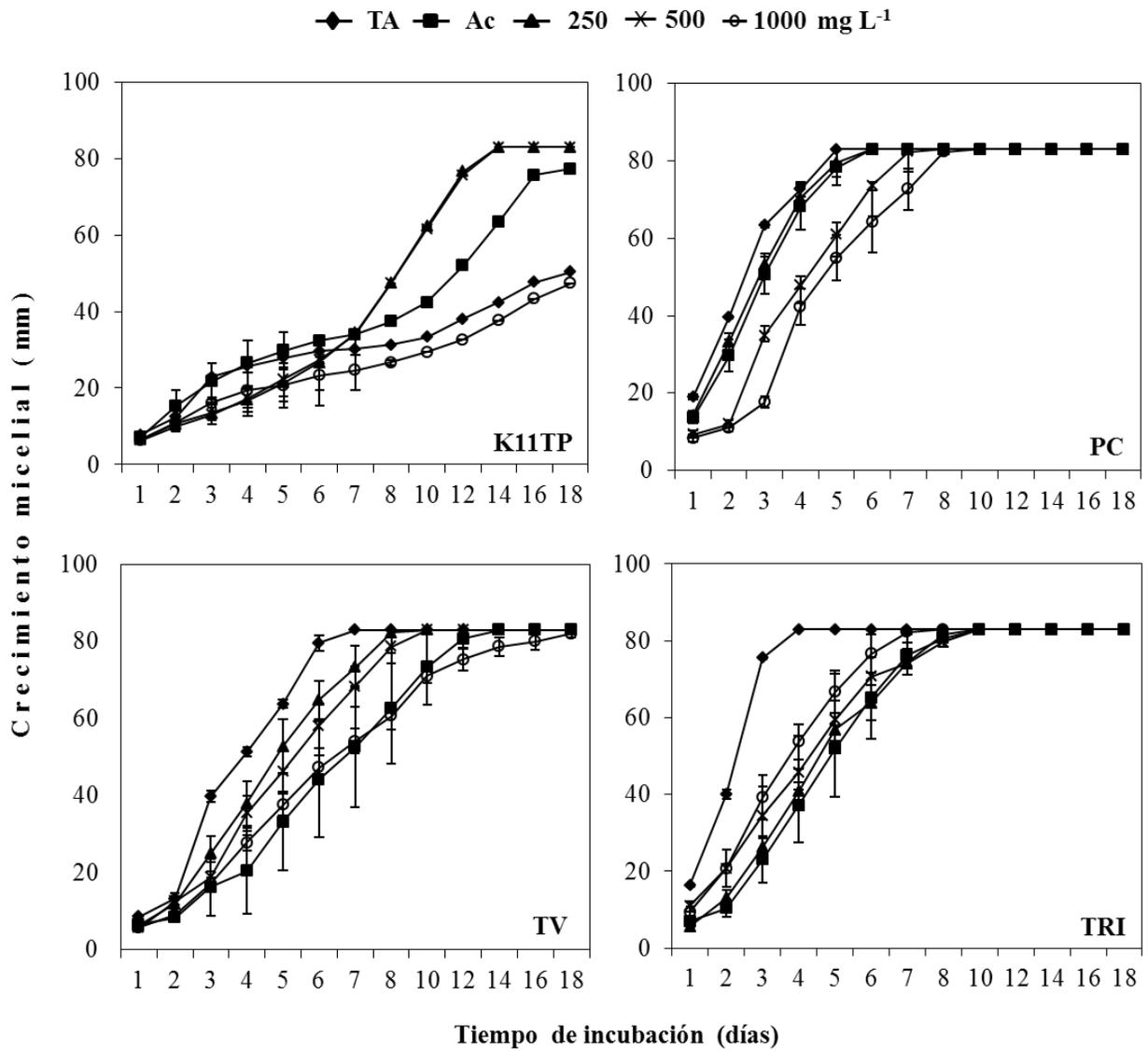


Figura 4.18 Dinámica de crecimiento de una cepa de hongos aislada de trozos de paja de trigo *Alternaria alternata* (K11TP) y tres cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) y *Trichoderma koningii* (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con diferentes dosis del insecticida endosulfán (mg L⁻¹). Simbología: TA= Testigo absoluto, Ac= Testigo acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

Finalmente, las cepas K1S, K11S y K3TP presentaron las dinámicas de desarrollo más lentas alcanzando entre 50 y 61.7 mm de diámetro de la colonia a los 18 días, aunque también se vieron afectadas por el insecticida pero con menor recuperación que el resto de las cepas. Sin embargo, no hubo diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) entre las diferentes dosis de EN indicando cierta tolerancia al insecticida (Figura 4.17).

De las 13 cepas aisladas de los diferentes sustratos se seleccionaron 7 de ellas para realizar futuros bioensayos de tolerancia con dosis más altas de EN y otros plaguicidas como clorpirifós (CRP) y clorotalonil. La cepa K14S (*Mucor circinelloides*) fue seleccionada por su rápido desarrollo, pero sobre todo por la capacidad de recuperación ante la presencia de EN. Esta especie, y otras especies del género *Mucor* han sido reportadas como tolerantes y degradadoras de contaminantes como dieldrín, compuestos clorinados, DDT, pentaclorofenol (PCP) y ácido abiético (Mitsukura *et al.* 2005, Kataoka *et al.* 2010, Carvalho *et al.* 2011, Purnomono *et al.* 2011).

Las cepas K2P (*Fusarium succisae*) y K12P (*F. moniliforme*) se vieron afectadas en el DM en presencia del EN, pero con buena recuperación, por lo que fueron seleccionadas. Además, se seleccionaron las cepas K1S (*F. oxysporum*) y K3TP (*F. moniliforme*) que aunque no mostraron la mejor respuesta de recuperación ante endosulfán en este bioensayo pudieran tener mejor respuesta a otros plaguicidas como lo indica Alleman *et al.* (1993). Al igual que el género *Mucor*, el género *Fusarium* ha sido reportado como hongos degradadores de compuestos xenobióticos como trifluralina e hidrocarburos del petróleo (HPA) o bisfenol (Yu *et al.* 1988, Chai *et al.* 2005, Verdin *et al.* 2005, Rafin *et al.* 2009).

La cepa K8S (*Penicillium janthinellum*) mostró desarrollo lento, no obstante, su DM en los tratamientos con EN no fueron significativamente diferentes al TA, y no mostró toxicidad ante el solvente acetona. En el caso de K11TP (*Alternaria alternata*) la selección se basó en la respuesta que presentó ante las dosis 250 y 500 mg de EN L⁻¹ y el solvente, ya que el DM en estos tratamientos fue mayor al encontrado en el TA. Se ha reportado la habilidad del género *Penicillium* para tolerar y bioacumular arsénico y degradar contaminantes como creosota, HPA y clorpirifós (Launen *et al.* 2000, Atagana *et al.* 2004, Maya *et al.* 2012); sin embargo, no existe información sobre el género *Alternaria* como degradador de plaguicidas.

4.4 CONCLUSIONES

Se obtuvieron 13 aislamientos de hongos filamentosos, de los cuáles siete cepas se aislaron de paja de trigo molida, cuatro de suelo agrícola y dos de trozos de paja de trigo. Las cepas K1P y K9P se identificaron como *Fusarium proliferatum*, mientras que las cepas K2P y K13P fueron *F. succisae*. Las cepas K8P, K12P, K14P y K3TP corresponden a la especie *F. moniliforme*, mientras que las cepas K1S y K11S se identificaron como *F. oxysporum* y *F. equiseti*, respectivamente. La cepa K8S se identificó como *Penicillium janthinellum*, mientras que K14S es un Zygomyceto de la especie *Mucor circinelloides*, y la cepa K11TP correspondió a *Alternaria alternata*. Ninguna de las cepas aisladas ni las cepas de referencia fueron patogénicas a las variedades de jitomate y trigo probadas.

Las cepas aisladas y las tres cepas de referencia (PC, TRI y TV) mostraron diferentes grados de tolerancia al ser expuestas al insecticida endosulfán (EN). El EN y el solvente acetona (Ac) causaron un efecto negativo sobre el DM de las cepas en estudio, siendo las cepas de referencia

las que se recuperaron en su totalidad y en menor tiempo. Se seleccionaron siete cepas tolerantes a EN, la cepa K14S fue el aislamiento con recuperación total ante las tres dosis de EN desde los 16 días, la cepa K8S mostró buena tolerancia ante el insecticida, mientras que la cepa K11TP se desarrolló mejor y más rápido ante 250 y 500 mg de EN L⁻¹ y el solvente Ac. Las cepas K2P y K12P fueron los aislamientos provenientes de paja con mejor recuperación ante el efecto del plaguicida. Las cepas K1S y K3TP tuvieron desarrollo lento y rezago en el DM ante EN, pero mostraron buena recuperación. Las cepas seleccionadas tienen potencial para ser evaluadas ante EN a dosis más altas y otros plaguicidas.

CAPÍTULO V

TOLERANCIA DE HONGOS FILAMENTOSOS ANTE ENDOSULFÁN, CLORPIRIFÓS Y CLOROTALONIL EN CONDICIONES *In Vtro*

RESUMEN

Los plaguicidas endosulfán (EN), clorpirifós (CRP) y clorotalonil (CTL) están catalogados como carcinógenos y persistentes en el ambiente, por lo que deben tomarse medidas eficientes de biorremediación para su degradación. Los hongos *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) y algunas especies de *Trichoderma* (TRI), *Mucor*, *Fusarium* y *Penicillium* pueden degradar plaguicidas. En este estudio se probaron siete cepas de hongos aislados de suelo agrícola, paja molida de trigo y trozos de paja de trigo. Las siete cepas fúngicas seleccionadas y tres cepas de referencia (PC, TV y TRI) se expusieron a medio mínimo mineral contaminado con dosis crecientes de EN, CRP y CTL durante 18 días. Diariamente se midió el desarrollo micelial (DM) y se calculó el porcentaje de inhibición del desarrollo (PID). Los tres plaguicidas tuvieron un efecto adverso sobre el DM, observándose una recuperación paulatina después de 72 h ante EN y CRP. En presencia de EN, las cepas K14S, PC, TV y TRI se recuperaron totalmente a los 18 días. Ante CRP, todas las cepas mostraron recuperación del DM desde el día 10. El fungicida (CTL) mostró los mayores PID, pero las cepas K8S, K14S, K11TP, PC y TV mostraron recuperación. Los aislamientos K12P, K8S, K14S, K11TP y las cepas de referencia PC, TV y TRI presentaron tolerancia a los plaguicidas en estudio por lo que pudieran ser consideradas para estudios sobre la biodegradación de plaguicidas.

Palabras clave: plaguicidas, insecticida organoclorado, insecticida organofosforado, fungicida policlorado, crecimiento fúngico, inhibición fúngica.

CHAPTER V

FUNGAL TOLERANCE TO INCREASED CONCENTRATIONS OF ENDOSULFAN, CHLORPYRIFOS AND CHLOROTHALONIL UNDER *In vitro* CONDITIONS

ABSTRACT

Endosulfan (EN), chlorpyrifos (CRP) and chlorothalonil (CTL) are carcinogenic and highly persistent pesticides in the environment, by which bioremediation efficient actions must be directed for their degradation. Fungi like *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) and some species of *Trichoderma* (TRI), *Mucor*, *Fusarium* and *Penicillium* may degrade pesticides. This research isolated and purified seven fungal strains from agricultural soil, wheat straw, and wheat straw pieces. The seven isolated fungal strains as well three referential fungi (PC, TV and TRI) were exposed to minimal mineral medium contaminated with increased doses of EN, CRP or CTL during 18 days. The mycelial growth (MG) was daily evaluated, and the percentage of growth inhibition (PGI) was also calculated. The three pesticides negatively affected the MG, but the fungal recovery was observed after 72 h for EN and CRP; however, CTL significantly inhibited ($P < 0.0001$) the MG for most fungal strains during 18 days. At 18 days, the strains K14S, PC, TV and TRI totally recovered when exposed to EN. Against CRP, all the fungal strains showed recuperation at the 10th day. The contamination with CTL (fungicide) resulted in highest PGI, but the strains K8S, K14S, K11TP, PC and TV showed a recovery. Besides referential strains (PC, TV and TRI), the fungal strains K12P, K8S, K14S, K11TP showed acceptable tolerance to the three pesticides. Thus, these strains are considered as good candidates to be used for pesticide bioremediation.

Key words: pesticides, chlorinated insecticide, organophosphate insecticide, polychlorinated fungicide, fungal growth, fungal inhibition.

5.1 INTRODUCCIÓN

Las actividades agrícolas, el uso excesivo y las malas prácticas de manejo de plaguicidas durante la producción agrícola, han llevado a la acumulación y contaminación de todos los ambientes debido a su dispersión, lixiviación y volatilización (Linde 1994, Arias-Estévez *et al.* 2008), por lo que son un riesgo para la salud humana y otros organismos (Bohmont 2007). El endosulfán es un insecticida organoclorado del grupo de los ciclodienos catalogado como carcinogénico, es de amplio uso en el sector agrícola, su metabolito el endosulfán sulfato, es más tóxico y persistente que la molécula parental (Greene y Pohanish 2005, Jayashree y Vasudevan 2007). El insecticida organofosforado clorpirifós es ampliamente usado para controlar plagas de importancia agrícola, humana y veterinaria, su persistencia es de hasta 120 días y está catalogado como carcinógeno y disruptor endócrino (Singh *et al.* 2006). El clorotalonil es un fungicida de contacto de amplio espectro, utilizado en diversos cultivos; tiene una vida media de hasta 90 días y está catalogado como un compuesto carcinógeno (Greene y Pohanish 2005).

Para remediar los problemas de contaminación por plaguicidas se han desarrollado técnicas de biorremediación mediante la selección y uso de microorganismos capaces de tolerar y degradar contaminantes. Los hongos degradadores de residuos ligninocelulósicos pueden degradar diversos contaminantes mediante la secreción de enzimas (Maloney 2001). Hongos ligninolíticos como *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, entre otros, son capaces de degradar hidrocarburos del petróleo y plaguicidas (Adam-Ali y Wainwright 1994, Kim *et al.* 2001, Jauregui *et al.* 2003, Matsubara *et al.* 2006). Además, los hongos no ligninolíticos como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma* son tolerantes y degradadores de plaguicidas e hidrocarburos (Mitra *et al.* 2001, Dan *et al.* 2006, Kim y Lee 2007, Sagar y Singh 2011, Argumedo-Delira *et al.* 2012).

El conocimiento de la capacidad de los microorganismos para degradar compuestos xenobióticos, ha permitido implementar procesos específicos de biorremediación conocidos como “biobeds” (BD), los cuáles están conformados por residuos vegetales, turba o composta y suelo (50:25:25%), colocados a 60 cm de profundidad para minimizar la contaminación por plaguicidas en las zonas donde se preparan sus mezclas (Torstensson 2000, Castillo *et al.* 2008, Karanasios *et al.* 2012). Para aumentar la capacidad y la velocidad de degradación de plaguicidas en las BD, se busca favorecer el desarrollo de hongos ligninolíticos. El potencial de estos hongos puede ser inhibido por la rápida invasión y competencia de otros microorganismos presentes en los diferentes componentes de la mezcla (Karanasios *et al.* 2012). Una alternativa es la adición de suelo o microorganismos capaces de degradar plaguicidas (Önneby *et al.* 2010, Karanasios *et al.* 2012).

Este trabajo consistió en seleccionar hongos aislados de paja de trigo y de suelo agrícola, con capacidad de tolerar endosulfán, clorpirifós y clorotalonil, como parte inicial de la búsqueda de hongos degradadores de plaguicidas, para utilizarlos en procesos de biorremediación.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Plaguicidas y cepas de hongos filamentosos

Los plaguicidas utilizados correspondieron a formulaciones grado técnico. El endosulfán (98 % pureza) fue donado por Bayer Cropscience, México S.A. de C.V., el clorpirifós (98 % pureza) por Dow-AgroSciences de México S.A. de C.V; y el clorotalonil (98.8 % pureza) por Syngenta Agro S.A. de C.V.

Los siete aislamientos fúngicos (K2P, K12P, K1S, K8S, K14S, K3TP y K11TP) estudiados en esta sección fueron aislados, purificados y seleccionados por su tolerancia a plaguicidas mediante

ensayos preliminares (ver capítulo anterior), incluyendo también tres cepas de referencia (PC, TV y TRI).

5.2.2 Pruebas de tolerancia a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil

Las dosis probadas para endosulfán (EN) fueron 0, 1000, 2000 y 3000 mg L⁻¹, para clorpirifós (CRP) 0, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mg L⁻¹, y para clorotalonil (CTN) 0, 25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹. Cada plaguicida fue diluido por separado con acetona grado reactivo (Fermont®); y se aplicaron de acuerdo con sus dosis, como única fuente de carbono sobre medio mínimo sólido (MMS) en cajas de Petri. La composición del MMS fue la siguiente (g L⁻¹): 0.5 (NH₄)₂SO₄, 0.5 KH₂PO₄, 0.2 KCl, 0.2 MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 CaCl₂, y 20 agar-agar.

Debido a que el solvente acetona provocó un fuerte efecto inhibitorio en varias de las cepas evaluadas ante endosulfán en los bioensayos realizados en el capítulo anterior, se determinó reducir la cantidad del solvente en los ensayos efectuados en esta fase de la investigación.

La contaminación del MMS se realizó en condiciones asépticas, distribuyendo 50 µL de la dilución del plaguicida correspondiente sobre la superficie de agar, con ayuda de una espátula de Drigalski. Los plaguicidas se probaron con sus respectivas dosis por triplicado, para cada cepa incluyendo un testigo absoluto (TA), y un testigo con acetona (Ac). Las cajas de Petri para el testigo Ac fueron tratadas con 50 µL de acetona sin plaguicida.

La siembra de las cepas se realizó colocando un sacabocados de la colonia fúngica con dos a seis días de edad, en el centro de la caja contaminada. Cada 24 h se cuantificó el desarrollo del micelio (DM) midiendo el diámetro (mm) de la colonia durante los primeros ocho días; después, la medición se llevó a cabo cada 48 h hasta los 18 días. Las cajas Petri se mantuvieron en incubadora (New Brunswick Scientific Inc. Edison) a 26 ± 1° C durante todo el bioensayo.

El porcentaje de inhibición del desarrollo micelial (PID) a los tres, ocho y 18 días, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$PID = 100 - \left(\frac{DM_{\text{trat}} \times 100}{DM_{\text{TA}}} \right)$$

Donde: DM_{trat} = Desarrollo micelial en el tratamiento con plaguicida, DM_{TA} = Desarrollo micelial en el testigo absoluto.

Los valores negativos del porcentaje de inhibición del desarrollo indicaron que los tratamientos o el testigo con acetona (Ac) presentaron mayor desarrollo micelial en comparación con el testigo absoluto (TA).

5.2.3 Análisis estadístico

Cada plaguicida fue analizado de manera individual, para lo cual el diseño experimental fue completamente al azar utilizando un factorial 10x4 (diez cepas de hongos y cuatro dosis) para endosulfán; 10x7 (diez cepas de hongos y siete dosis) para clorpirifós, y 10x6 (diez cepas de hongos y seis dosis) para clorotalonil. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$) mediante el programa Statistical Analysis System (SAS 2002).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Tolerancia al insecticida endosulfán (EN)

En general, el EN tuvo un efecto adverso significativo ($P < 0.0001$) en el crecimiento de todas las cepas probadas (Figura 5.1A). En cuanto al factor concentración de EN, los hongos en ausencia del insecticida (TA y Ac) no mostraron diferencias significativas entre sí hasta el día 12, cuando el tratamiento Ac presentó mayor desarrollo micelial con respecto a TA (Figura 5.1A).

Los tratamientos con EN no mostraron diferencias significativas entre sí, indicando el mismo crecimiento incluso en la concentración más alta de EN (Figura 5.1A).

En cuanto a los porcentajes de inhibición (PI) el comportamiento general mostró los PI más altos para todas las cepas, entre los dos y tres días, pero a partir del día cuatro disminuyó gradualmente hasta presentar menos del 13% de inhibición a los 18 días (Figura 5.1B). El tratamiento Ac tuvo un ligero efecto adverso sobre el desarrollo al inicio del bioensayo. A partir del día 5 y hasta el día 18 se obtuvieron porcentajes de inhibición negativos, indicando un mayor desarrollo micelial en Ac en comparación con TA (Figura 5.1B).

Las dinámicas de crecimiento observadas en las figuras 5.2 y 5.3 muestran el comportamiento del desarrollo micelial (DM) de las cepas. En ausencia del insecticida (TA y Ac) las cepas PC, TRI y K14S cubrieron la caja de Petri totalmente a los 4, 6 y 7 días, respectivamente; en presencia del insecticida el DM se vio afectado levemente, recuperándose por completo a los 6, 10 y 16 días, respectivamente (Figuras 5.2 y 5.3). Las cepas TV y K8S cubrieron la caja en su totalidad a los 16 y 18 días en los testigos, respectivamente. Ante 1000, 2000 y 3000 mg de EN L⁻¹, la cepa TV se recuperó totalmente a los 12 días. Por su parte, la cepa K8S no presentó una recuperación total, aunque no mostró diferencias significativas entre las tres dosis del contaminante y los testigos (Figuras 5.2 y 5.3).

Las cepas K2P, K12P K1S, K3TP y K11TP (Figuras 5.2 y 5.3), mostraron el crecimiento más lento y no hubo diferencias significativas entre los testigos TA y Ac. En contraste, la presencia de EN afectó significativamente ($P < 0.0001$) el desarrollo micelial en comparación con los testigos, con excepción de la cepa K3TP (Figura 5.2).

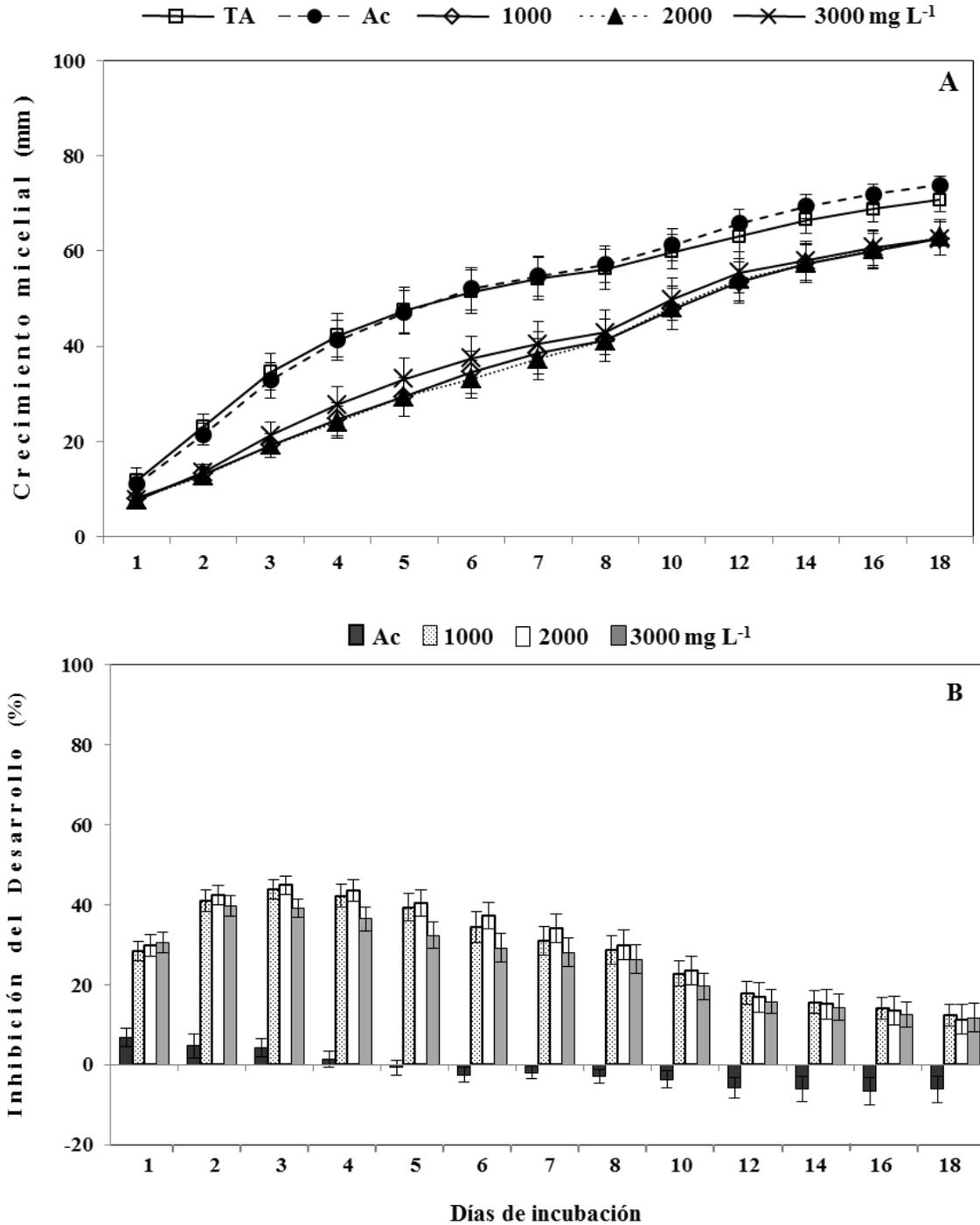


Figura 5.1 Efecto del endosulfán en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición. A) crecimiento fúngico por efecto de tres concentraciones de endosulfán (mg L^{-1}) y B) porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico con respecto al testigo absoluto. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo con acetona. Medias \pm error estándar, $n=3$.

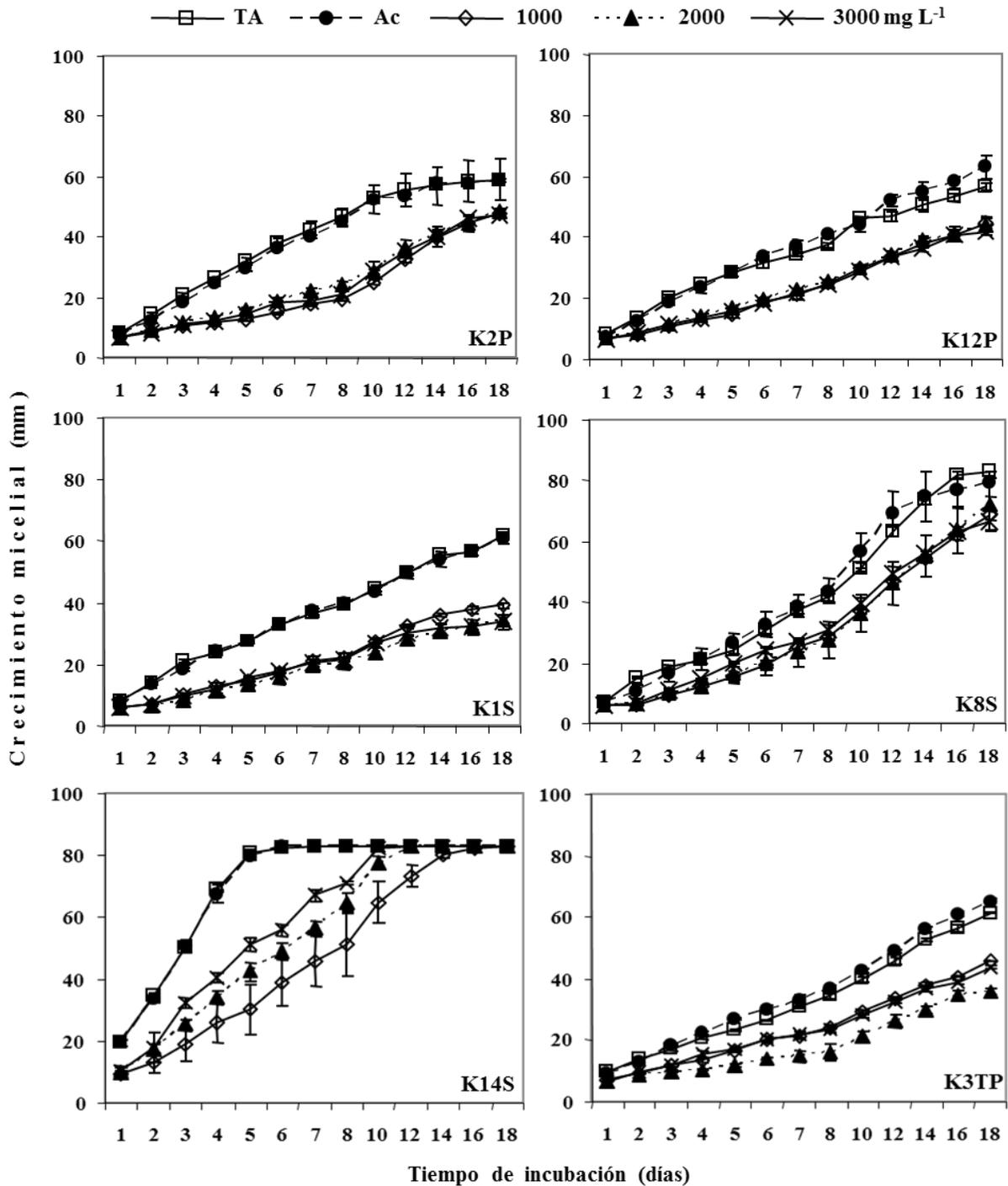


Figura 5.2 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes endosulfán (mg L⁻¹). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

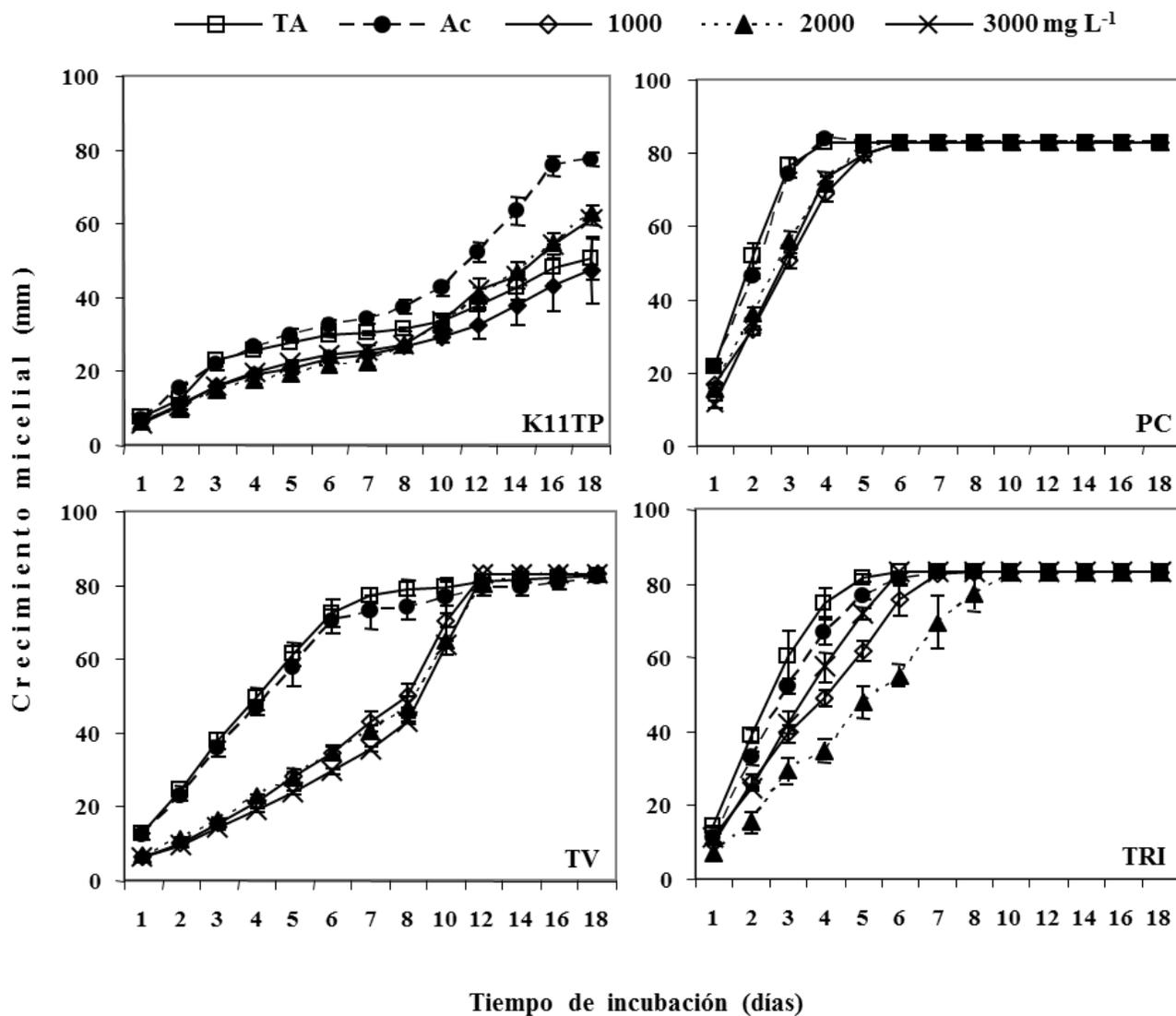


Figura 5.3 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), *Alternaria alternata* (K11TP) y tres cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) y *Trichoderma koningii* (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes endosulfán (mg L⁻¹) durante 18 días. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias ± error estándar, n=3.

El EN tuvo un efecto adverso en el desarrollo de las cepas K2P, K12P K1S, K3TP y K11TP (Figuras 5.2 y 5.3); sin embargo, hubo buena recuperación a los 18 días y no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes dosis del insecticida (Figura 5.2 y 5.3). La mayoría de las cepas mostraron una ligera inhibición en el DM con el solvente (Ac), pero con recuperación entre los 3 y 10 días (Figuras 5.2 y 5.3).

Con respecto a los porcentajes de inhibición de desarrollo (PID) por efecto del EN, todas las cepas fúngicas mostraron inhibición durante los primeros tres días. Las cepas PC, K11TP y K8S fueron las menos inhibidas por el insecticida en comparación con sus respectivos testigos. En contraste, las cepas con mayor inhibición fueron TV, K14S y K1S (Figura 5.4A).

Para el día ocho, los valores de PID para las cepas PC y TRI fueron de cero por ciento en todos los tratamientos de EN, con excepción de TRI ante 2000 mg L^{-1} (Figura 5.4B) cuyo PID fue 6.8%. En contraste, las cepas K12P, K1S, K8S, K3TP y K11TP tuvieron porcentajes de inhibición entre 15 y 55%, mientras que la cepa K2P tuvo los PID más altos, cuyos valores alcanzaron hasta 60% (Fig. 5.4B).

A los 18 días, las cepas TRI y K14S mostraron recuperación total al presentar cero por ciento de inhibición en todos los tratamientos mientras que las cepas K1S y K3TP presentaron inhibición mayor al 45% (Figura 5.4C). Los valores de PID negativos que mostró TV y particularmente la cepa K11TP, indicaron mejor DM en los tratamientos con EN con respecto al TA, a excepción de K11TP ante 1000 mg L^{-1} (Figura 5.4C). Las cepas K12P, K8S, K3TP y K11TP presentaron mayor DM en el testigo acetona en comparación con el TA (Figura 5.4C).

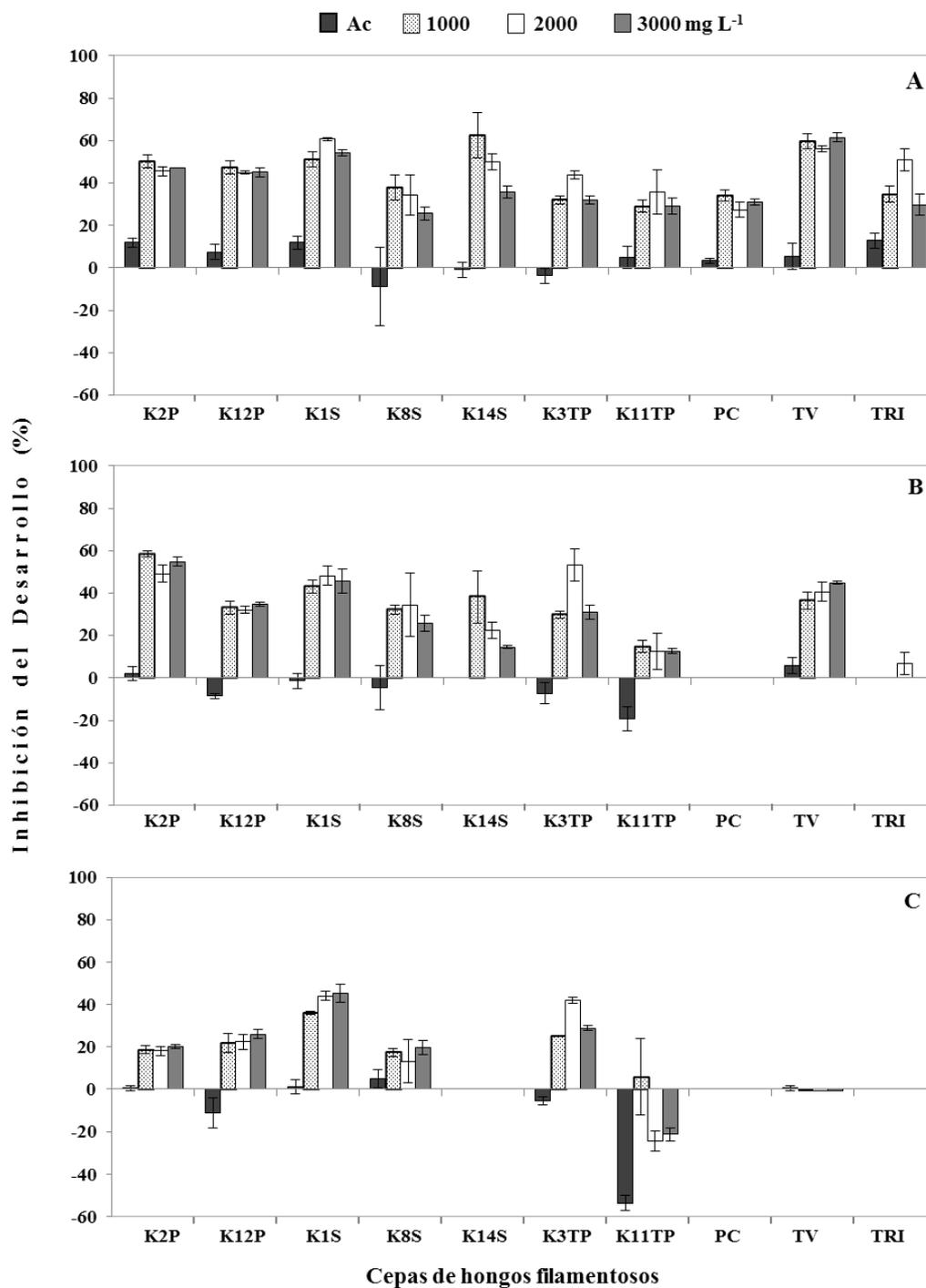


Figura 5.4 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de diez hongos filamentosos expuestos a dosis crecientes de endosulfán (mg L⁻¹). A) tres días de exposición; B) ocho días de exposición, y C) 18 días de exposición. Los valores de PID negativos indican mayor desarrollo micelial en el tratamiento con respecto al testigo absoluto (TA). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, K11TP= *Alternaria alternata*, PC= *Phanerochaete chrysosporium* (PC), TV= *Trametes versicolor*, TRI= *Trichoderma koningii*, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

El EN disminuyó el DM en todas las cepas durante los primeros tres días con recuperación gradual. Este efecto inhibitorio ha sido reportado por Mukherjee y Mittal (2005) al encontrar que *Aspergillus terreus* y *Cladosporium oxysporum* expuestos a EN incrementaron la disipación del insecticida a partir del tercer día. Hussain *et al.* (2007b) encontraron poca degradación de EN durante los primeros tres días y observaron un notorio incremento en la degradación al sexto día de incubación con *A. terreus*, *A. terricola* y *Chaetosartorius stromatoides*. Bhalerao y Puranik (2007) indican que *A. niger* mostró inhibición de su biomasa seca ante EN, y después de la etapa de adaptación el hongo creció rápidamente, superando la biomasa obtenida en el testigo desde el segundo día de la contaminación.

Roca *et al.* (2009) observaron que el hongo *Agrocybe aegerita* mostró mayor DM con 500 mg L⁻¹ de pendimetalina en comparación con dosis más bajas (0 y 100 mg L⁻¹) después del cuarto día. En este trabajo, las cepas K14S, TRI, K8S, K11TP y K3TP presentaron mejor DM ante la dosis más alta de EN (3000 mg L⁻¹) en comparación con 1000 y 2000 mg L⁻¹ entre los primeros 3 y 4 días (Figuras 5.3 y 5.4).

5.3.2 Tolerancia al insecticida clorpirifós (CRP)

De manera general, las dosis de CRP (100, 250, 500, 1000 y 2000 mg L⁻¹) tuvieron un efecto adverso significativo ($P < 0.0001$) sobre todas las cepas con respecto al TA (Figura 5.5A). A partir del día 8 y hasta el día 18 no se encontraron diferencias significativas entre las dosis 100, 250, 500 y 1000 mg L⁻¹, ni con respecto a los testigos TA y Ac (Figura 5.5A).

En la Figura 5.5B, se observa el comportamiento general de la inhibición de desarrollo de las cepas por efecto del CRP. La mayor inhibición ocurrió entre los dos y tres días, y a partir del cuarto día disminuyó paulatinamente hasta alcanzar menos del 2% de inhibición en el día 8, con excepción de CRP 2000 mg L⁻¹ (16.3%).

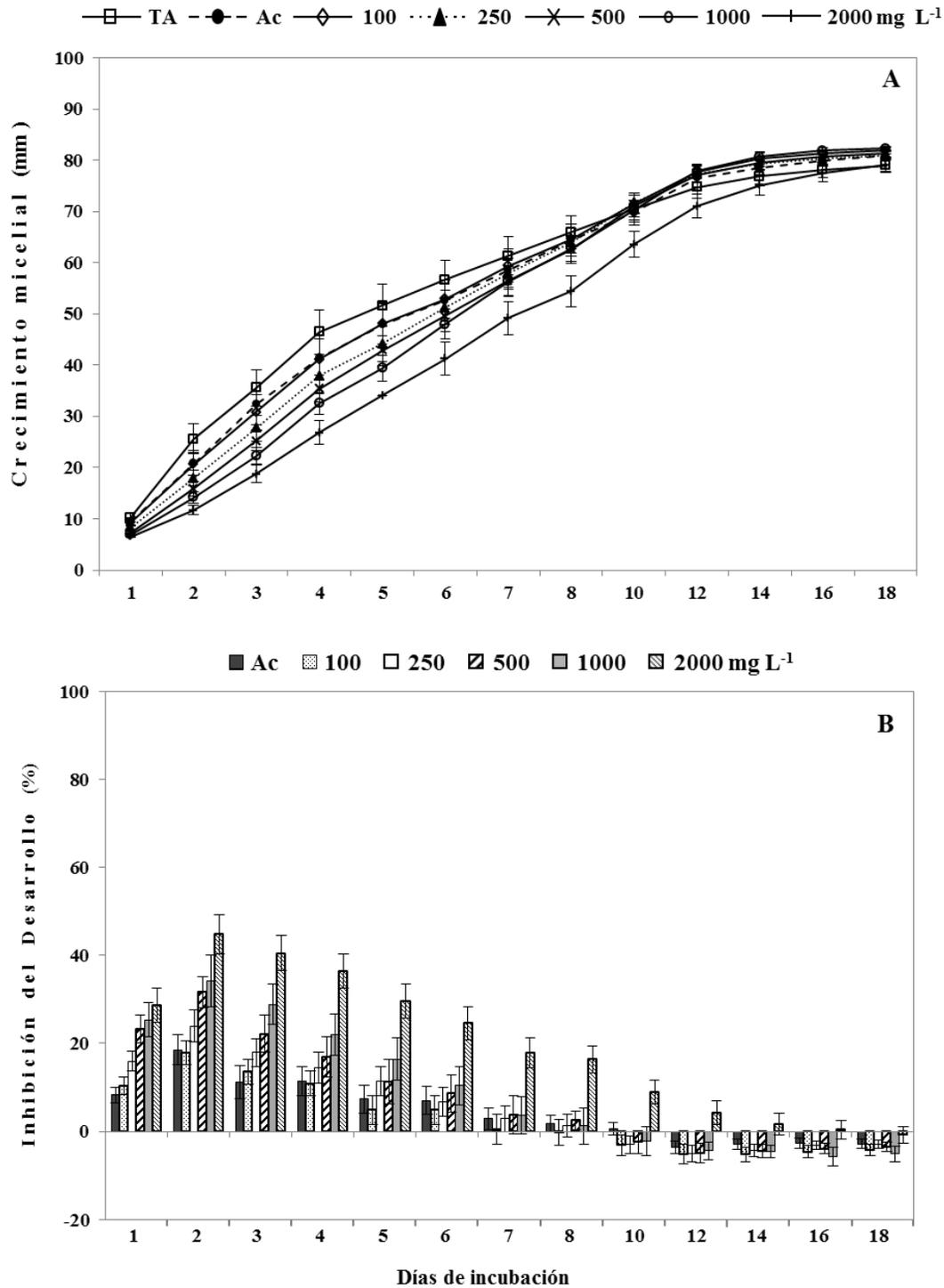


Figura 5.5 Efecto del clorpirifós en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición. A) crecimiento fúngico por efecto de cinco concentraciones de clorpirifós (mg L^{-1}), y B) porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico con respecto al testigo absoluto. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo con acetona. Medias \pm error estándar, $n=3$.

En congruencia con el desarrollo micelial (Figura 5.5A), a partir del día 10 las dosis de CRP de 100, 250, 500 y 1000 mg L⁻¹ presentaron valores de PID negativos mientras que Ac presentó valores de PID negativos en el día 12, lo que denotó un mayor crecimiento con respecto al TA (Figura 5.5B).

El DM de las cepas PC, TRI y K14S se inhibió inicialmente por la presencia de CRP; con recuperación total a los 7, 10 y 12 días, respectivamente; en ausencia del plaguicida estas cepas alcanzaron el desarrollo máximo a los 4, 5 y 6 días, respectivamente (Figura 5.6 y 5.7).

La cepa TV mostró menor DM ante las cinco dosis de CRP en comparación con los testigos, pero tuvo una recuperación total a los 12 días (Figura 5.7). Las cepas K11TP y K8S cubrieron la superficie de agar a los 10 y 14 días, respectivamente, en ausencia del insecticida; en contraste, ambas cepas mostraron disminución del DM en presencia de CRP, no obstante, se recuperaron totalmente a los 14 y 16 días, respectivamente (Figuras 5.6 y 5.7). Por su parte, las cepas K2P, K12P, K1S y K3TP (Figura 5.6) superaron el DM en comparación a sus testigos entre los días 3 y 8 cuando se expusieron las diferentes dosis de CRP, con excepción de K2P y K12P ante 2000 mg L⁻¹.

Con respecto al porcentaje de inhibición, el CRP inhibió el desarrollo en todas las cepas en los primeros tres días, con excepción de la cepa K12P cuyos valores de PID fueron negativos con Ac, 250, 500 y 1000 mg L⁻¹, la mayoría de las cepas mostraron ligera inhibición en el DM ante Ac (Figura 5.8A). Las cepas PC, TRI, K14S y TV tuvieron los PID más altos con respecto a sus testigos, y las cepas menos inhibidas fueron K1S, K3TP y K2P (Figura 5.8A).

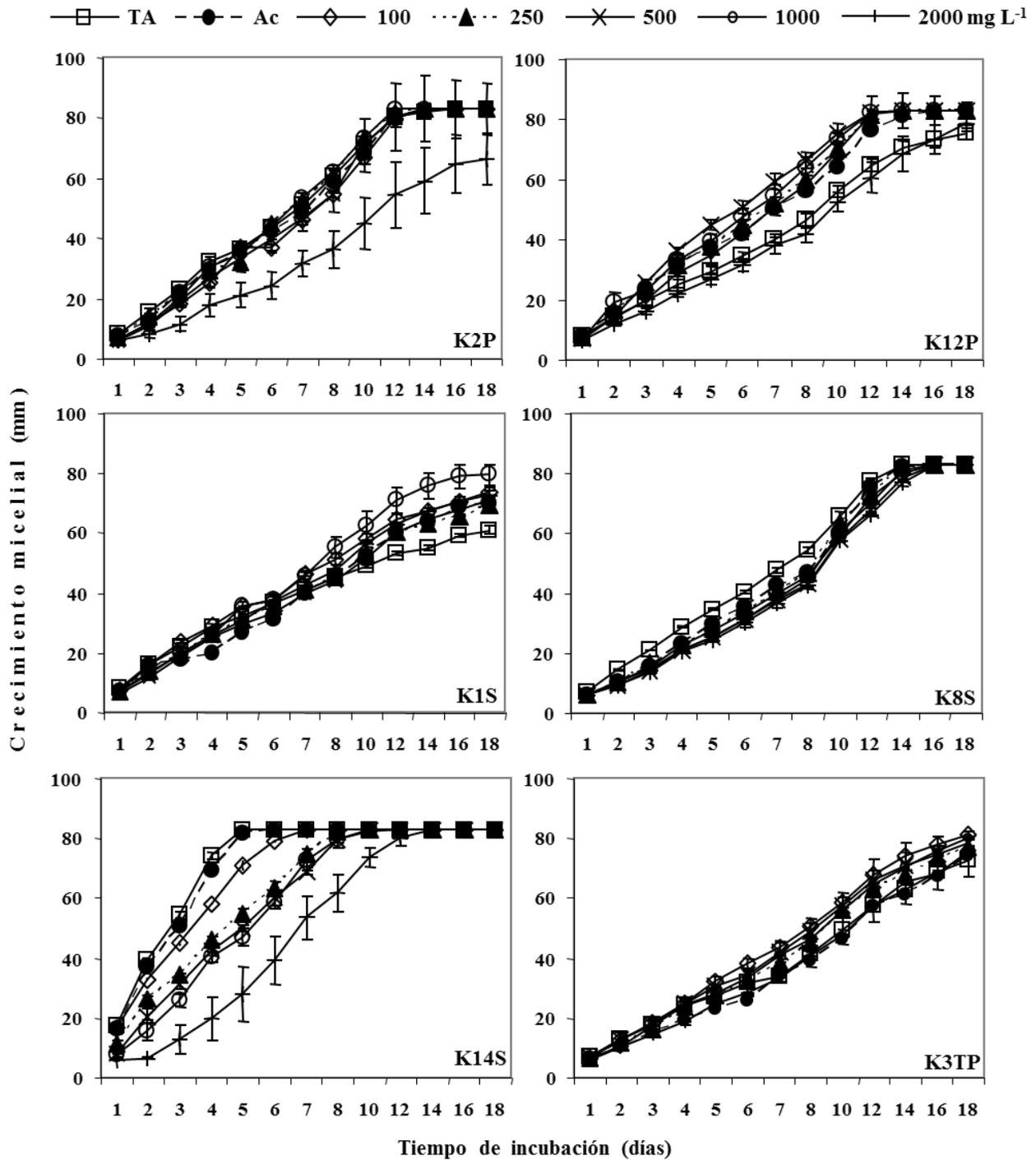


Figura 5.6 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorpirifós (mg L⁻¹). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

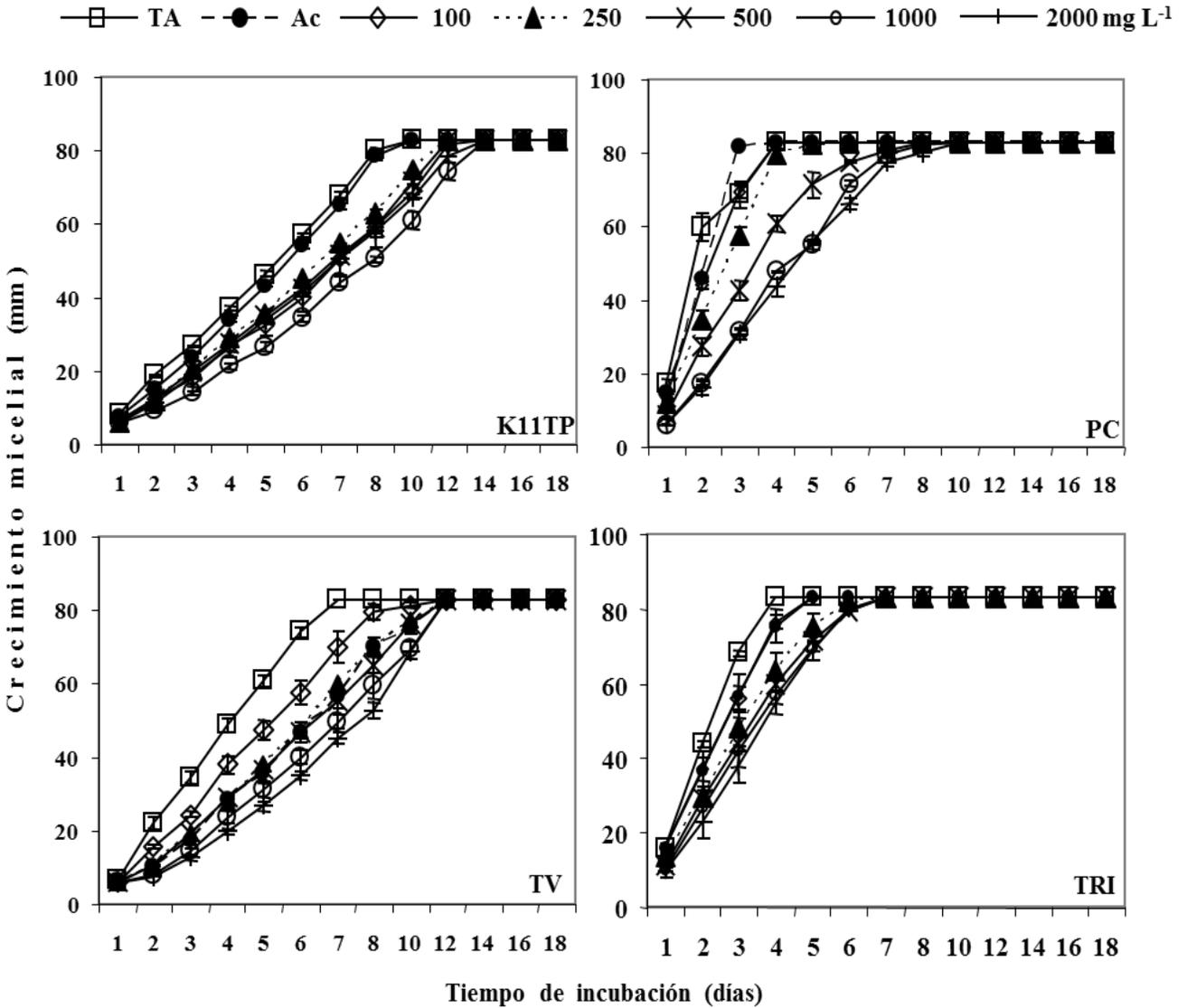


Figura 5.7 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), *Alternaria alternata* (K11TP) y tres cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) y *Trichoderma koningii* (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorpirifós (mg L⁻¹) durante 18 días. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias ± error estándar, n=3.

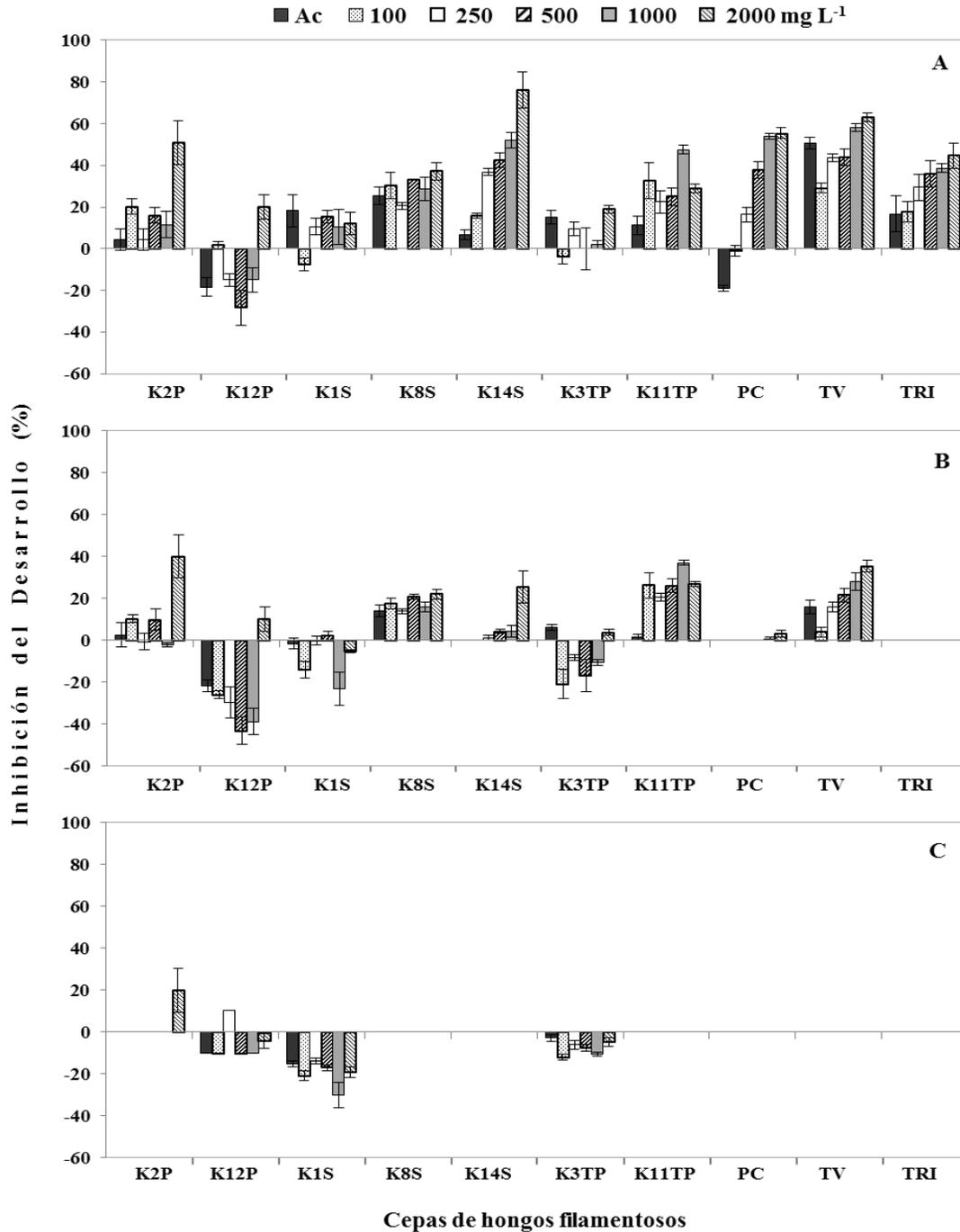


Figura 5.8 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de hongos aislados de paja molida de trigo, trozos de paja de trigo, suelo agrícola y cepas de referencia, expuestas a dosis crecientes de clorpirifós. A) tres días de exposición B) ocho días de exposición y C) 18 días de exposición. Los valores de PID negativos indican mayor desarrollo micelial en el tratamiento con respecto al testigo absoluto (TA). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, K11TP= *Alternaria alternata*, PC= *Phanerochaete chrysosporium* (PC), TV= *Trametes versicolor*, TRI= *Trichoderma koningii*, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

En el octavo día, la cepa TRI presentó cero por ciento de inhibición en todos los tratamientos, mientras que PC y K14S mostraron 3.2 y 26% de inhibición ante 2000 mg CRP L⁻¹, respectivamente (Figura 5.8B). Las cepas TV, K11TP, K8S y K2P continuaron inhibidas hasta en 40% con respecto a sus testigos; en contraste, las cepas K12P, K1S y K3TP mostraron valores de PID negativos, indicando mayor DM en los tratamientos con CRP con respecto al TA (Figura 5.8B).

Para el día 18, todas las cepas presentaron cero por ciento de inhibición por efecto del CRP, excepto la cepa K2P ante 2000 mg L⁻¹ (Figura 5.8C) y las cepas K12P, K1S y K3TP continuaron mostrando mayor desarrollo en los tratamientos con respecto al testigo (Figura 5.8C).

El insecticida CRP mostró un efecto adverso sobre el DM de todas las cepas a los tres días, pero con una recuperación total a los 18 días. La inhibición inicial de clorpirifós sobre el desarrollo fúngico, coincide con lo reportado por Fang *et al.* (2008) quienes encontraron que CRP (100 mg L⁻¹) redujo la biomasa de *Verticillium* sp. durante los primeros cinco días y posteriormente incrementó rápidamente. Un comportamiento similar fue descrito por Liu *et al.* (2002) con *Trichoderma* ante CRP (50 mg L⁻¹), presentando en un inicio baja tasa de degradación (19.7%) con un incremento considerable (88.5%) a los 7 días.

En comparación con EN, el CRP causó mayor inhibición sobre las cepas fúngicas a los tres días (Figura 5.8). La mayoría de las cepas mostraron reducción en sus PID desde los 10 días, recuperándose totalmente a los 18 días; mientras que ante EN, un número mayor de cepas continuaron inhibidas hasta los 18 días (Figura 5.4). Este retraso en la recuperación del DM pudo deberse a que el EN (organoclorado) es químicamente más estable, acumulable y persistente (Ware 1994), además de tener una presión de vapor baja (1.7×10^{-7} mm Hg a 20° C) (Green y Pohanish 2005), lo que lo hace una molécula de poca volatilidad. En contraste, la presión de vapor de CRP es media (1.87×10^{-5} mm Hg a 25° C) y sus propiedades como organofosforado lo

hacen menos persistente y menos tóxico (Ware 1994, Green y Pohanish 2005). La residualidad y la complejidad de la estructura del EN pudo provocar que los hongos se recuperaran en mayor tiempo o en su defecto estuviera menos disponible como fuente de carbono para las cepas en comparación con el CRP (Fewson 1988). De igual forma, Matsubara *et al.* (2006) encontraron que nueve especies de hongos crecieron mejor ante fenantreno (3 anillos) que ante el pireno (6 anillos).

Algunas cepas expuestas a CRP (K12P, K1S y K3TP) o a EN (K11TP) superaron el DM de sus respectivos testigos después de un periodo de inhibición (3-16 días). Dutta *et al.* (2010) encontraron un estímulo en la respiración basal y en la biomasa microbiana al aplicar CRP en comparación con el testigo. Das y Mukherjee (2000) y Eisenhauer *et al.* (2009) obtuvieron un incremento en la población de microorganismos en el suelo después de la aplicación de plaguicidas OC y OP. En cuanto a los hongos, Field *et al.* (1992) observaron que *Bjerkandera* sp. mostró mayor respiración en presencia de benzo[a]pireno, antraceno y antraquinona. Por su parte, Bhalerao y Puranik (2007) encontraron mayor biomasa fúngica de *A. niger* en presencia de EN, debido probablemente a su disponibilidad como fuente de carbono y sulfuro en el medio. Siddique *et al.* (2003) reportan que *Fusarium ventricosum* fue capaz de utilizar EN como única fuente de carbono. Es probable que en la presente investigación las cepas fúngicas que superaron el DM con respecto a sus testigos, además de tolerar, pudieron haber utilizado los insecticidas (EN y CRP) como fuente de energía para su desarrollo, una vez superado el periodo de inhibición. Sin embargo, se requiere de mayor estudio al respecto.

5.3.3 Tolerancia al fungicida clorotalonil (CTL)

En general, las dosis de CTL (25, 50, 100 y 200 mg L⁻¹) mostraron un efecto adverso significativo (P<0.0001) sobre el DM de las cepas (Figura 5.9A). Al día 8 las cepas expuestas a

las diferentes dosis del fungicida no rebasaron los 30 mm de diámetro mientras que los testigos superaban los 64 mm (Figura 5.9A). Al final del bioensayo (18 días), el CTL en todas sus concentraciones continuó afectando el DM de las cepas, alcanzando menos de 60 mm de diámetro de las colonias, mientras que los testigos estaban próximos a obtener el crecimiento máximo (83 mm) (Figura 5.9A). El solvente acetona tuvo un efecto adverso significativo ($P < 0.0001$) sobre el DM con respecto al TA hasta el día 8; a partir de esta fecha, no mostró diferencias significativas con el TA aunque en el día doce el disolvente superó en DM del TA (Figura 5.9A).

Los más altos porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) se registraron entre los 3 y 5 días (75% de inhibición en promedio), y fueron disminuyendo muy lentamente hasta el día 8 (65%). A los 18 días, las cepas aún presentaban valores de PID mayores al 37%, con excepción de la dosis CTL de 25 mg L^{-1} cuyo valor fue de 25.8% (Figura 5.9B). Las concentraciones de 50, 100 y 200 mg L^{-1} no fueron significativamente diferentes entre sí pero si hubo diferencias significativas con Ac y la dosis 25 mg L^{-1} (Figura 5.9B).

Las dinámicas de crecimiento de las cepas K8S y PC se vieron afectadas por el fungicida; con recuperación a partir del día 10 (Figuras 5.10 y 5.11). En el día 18 en la concentración de 25 mg L^{-1} , la cepa PC alcanzó 83 mm de diámetro, mientras que la colonia de K8S alcanzó 79 mm, y en ambos casos no hubo diferencias significativas entre esta dosis y los testigos (Figuras 5.10 y 5.11).

El CTL afectó el DM de las cepas K14S, K11TP y TV pero se recuperaron a los 18 días, los diámetros de las colonias fluctuaron entre 53 y 83 mm; además, el DM con las diferentes dosis de CTL no fue significativamente diferente con respecto a TA y Ac (Figuras 5.10 y 5.11).

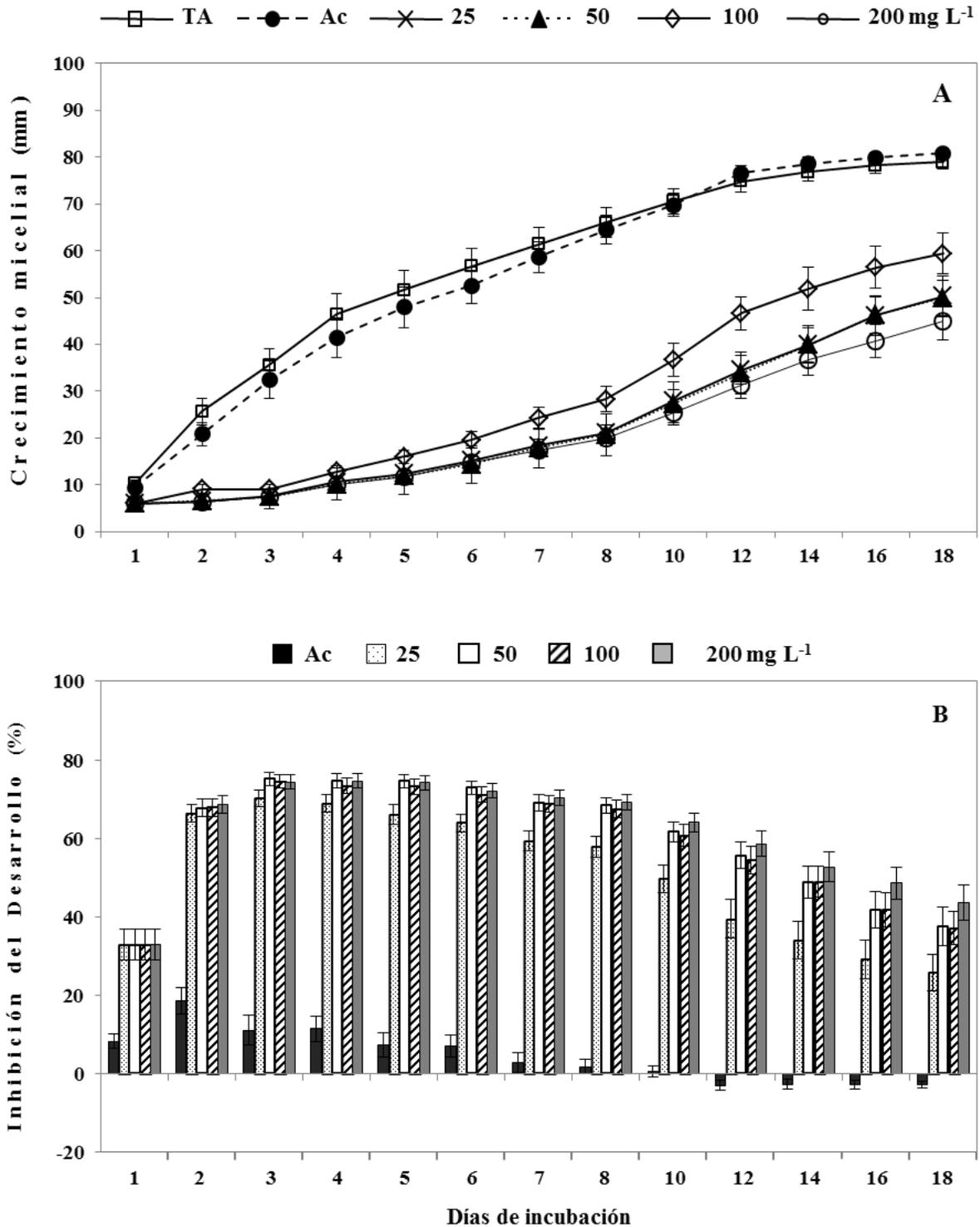


Figura 5.9 Efecto del fungicida clorotalonil en el crecimiento micelial de las cepas después de 18 días de exposición. A) crecimiento fúngico por efecto de cuatro concentraciones de clorotalonil (mg L^{-1}) y B) porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico con respecto al testigo absoluto. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo con acetona. Medias \pm error estándar, $n=3$.

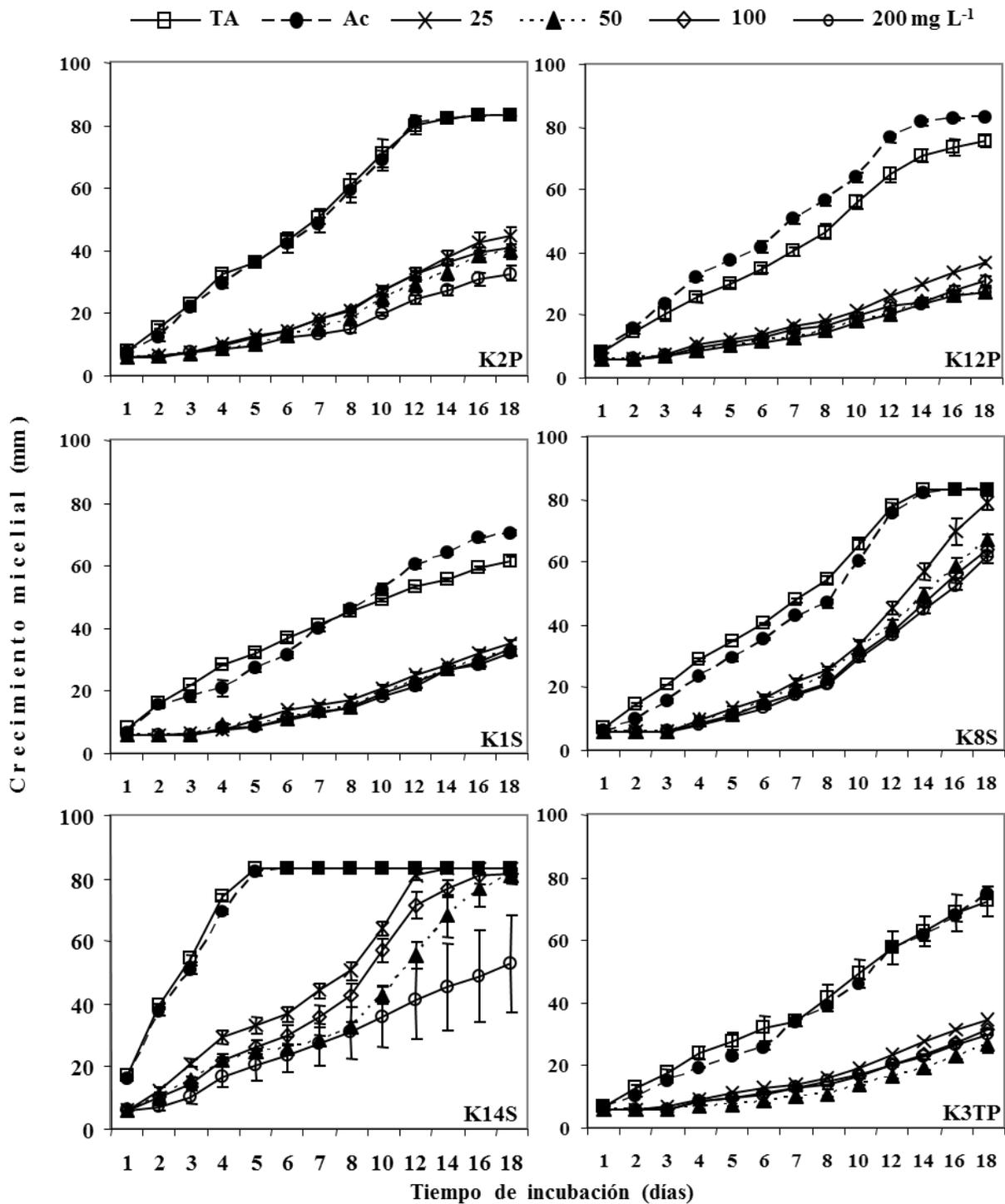


Figura 5.10 Dinámica de crecimiento de cepas de hongos aisladas de paja molida de trigo (P), suelo agrícola (S) y trozos de paja de trigo (TP), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorotalonil (mg L⁻¹). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias ± error estándar, n=3.

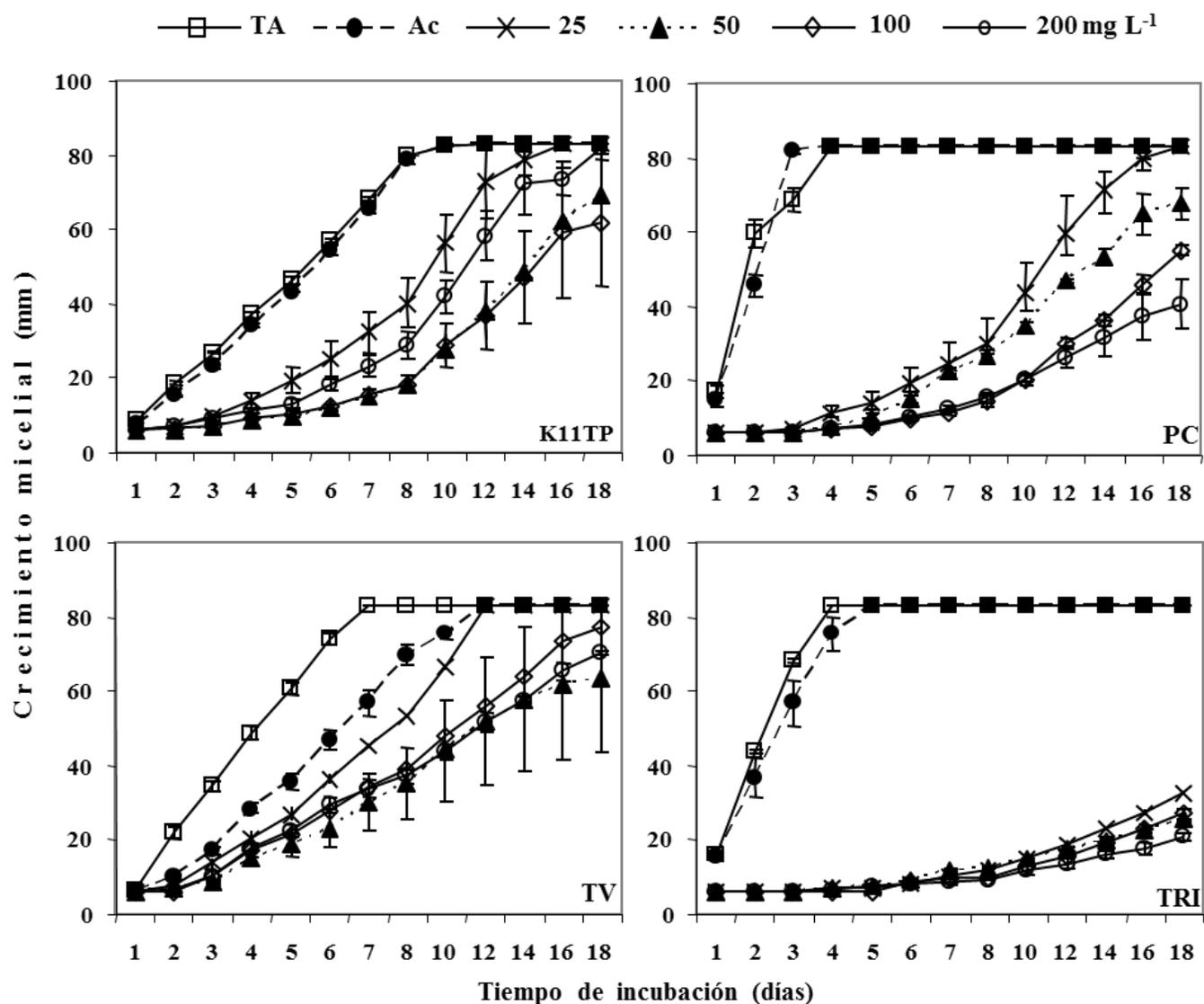


Figura 5.11 Dinámica de crecimiento de una cepa fúngica aislada de trozos de paja de trigo (TP), *Alternaria alternata* (K11TP) y tres cepas de referencia *Phanerochaete chrysosporium* (PC), *Trametes versicolor* (TV) y *Trichoderma koningii* (TRI), expuestas a medio mínimo sólido contaminado con dosis crecientes de clorotalonil (mg L^{-1}) durante 18 días. Simbología: TA= Testigo Absoluto, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

Las colonias de las cepas K2P, K12P, K1S y K3TP solo alcanzaron 40 mm de diámetro a los 18 días y el DM de estas cepas fue significativamente diferente (Tukey $\alpha=0.05$) con respecto al TA y Ac (>70 mm) (Figura 5.10). La cepa más afectada por el CTL fue TRI, cuyo DM fue menor a 8 mm en el quinto día y de apenas 32 mm a los 18 días, mientras que los testigos TA y Ac alcanzaron los 83 mm a los 4 y 5 días, respectivamente (Figura 5.11).

Con respecto a los PID, las cepas más afectadas por CTL a los tres días fueron TRI y PC (>90%), seguidas por la cepa K14S (81%) mientras que para el resto de las cepas (K2P, K12P, K1S, K8S, K3TP, K11TP y TV) los valores de PID fueron de hasta 75.7% (Figura 5.12A). En el octavo día la cepa TRI presentó PID mayores a 85%, la cepa TV fue la cepa menos inhibida presentando 58% en la dosis más alta de CTL, mientras que la cepa K14S mostró 39% de inhibición ante 25 mg L⁻¹ (Figuras 5.12B).

Al día 18, la cepa TRI continuó siendo la cepa más afectada (PID >60%), mientras que las cepas K2P, K12P, K1S y K3TP tuvieron valores de PID mayores a 42% (Figura 5.12C). Las cepas K8S, K14S, K11TP, PC y TV se recuperaron totalmente al mostrar cero por ciento de inhibición ante 25 mg L⁻¹, además las cepas K14S, K11TP y TV no presentaron diferencias significativas entre las dosis 50, 100 y 200 mg L⁻¹ con respecto al testigo Ac, indicando tolerancia al CTL. Las cepas se vieron afectadas con Ac al inicio, aunque en porcentajes bajos (Figura 5.12C) y con recuperación de la mayoría de las cepas desde los 8 días (Figura 5.12B) y recuperación total de todas las cepas a los 18 días (Figura 5.12C).

El CTL produjo mayor toxicidad para los hongos al producir altos PID (>60%) hasta los 18 días. Similarmente Singh *et al.* (2002) observaron que este fungicida (10 mg kg⁻¹) tuvo un fuerte efecto inhibitorio sobre microorganismos del suelo durante 90 días, en comparación con CRP (10 mg kg⁻¹) cuyos efectos inhibitorios no fueron mayores a 30 días.

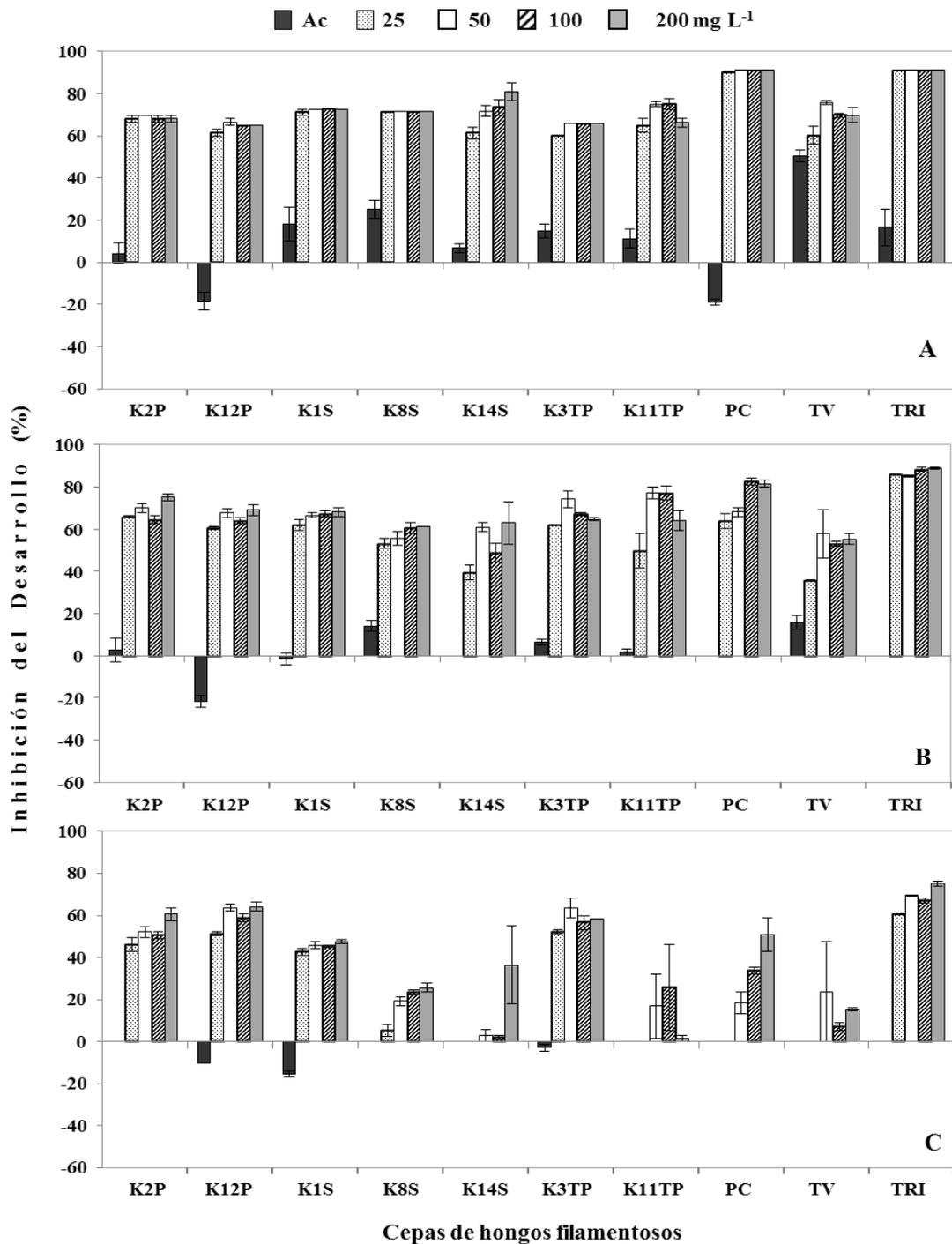


Figura 5.12 Porcentajes de inhibición del desarrollo (PID) de hongos aislados de paja molida de trigo, trozos de paja de trigo, suelo agrícola y cepas de referencia, expuestas a dosis crecientes de clorotalonil. A) tres días de exposición B) ocho días de exposición y C) 18 días de exposición. Los valores de PID negativos indican mayor desarrollo micelial en el tratamiento con respecto al testigo absoluto (TA). Simbología: K2P= *Fusarium succisae*, K12P= *F. moniliforme*, K1S= *F. oxysporum*, K8S= *Penicillium janthinellum*, K14S= *Mucor circinelloides*, K3TP= *F. moniliforme*, K11TP= *Alternaria alternata*, PC= *Phanerochaete chrysosporium* (PC), TV= *Trametes versicolor*, TRI= *Trichoderma koningii*, Ac= Testigo Acetona, Ac= Testigo Acetona. Medias \pm error estándar, n=3.

La prolongada inhibición del desarrollo en la mayoría de las cepas ante CTL se puede explicar por su acción fungicida, el cual afecta principalmente las enzimas implicadas en la respiración y en la biosíntesis de proteínas (Tillman *et al.* 1973). Por lo anterior, es probable que las cepas fúngicas expuestas a CTL no hayan podido recuperarse durante el bioensayo (18 días) como lo hicieron ante EN y CRP. Sin embargo, varias cepas se recuperaron totalmente ante la concentración más baja de CTL (25 mg L⁻¹).

Una respuesta similar es reportada por Guillén *et al.* (2009) quienes encontraron que los preservadores de madera a base de cromo-cobre-arseniato (CCA-C) y boro-silicón (BS) inhibieron el desarrollo de cepas fúngicas entre 80 y 100%, aunque las cepas *Gloeophyllum* sp (8), *T. versicolor* (88) y *Ganoderma australe* (87, 100 y A464) fueron tolerantes a la dosis más baja de CCA-C y BS. Adam-Ali y Wainwright (1994) encontraron que *P. chrysosporium* fue afectado por benomil en su dosis más alta (225 µg g⁻¹ de suelo). En el presente estudio, las cepas K8S, K14S, K11TP, PC y TV fueron tolerantes a la dosis más baja de CTL (25 mg L⁻¹).

El disolvente acetona (Ac) provocó inhibición en el DM en todas las cepas entre los tres y 10 días (Figuras 5.1, 5.5 y 5.9) con recuperación al final de los bioensayos (18 días) y en muchos casos, el desarrollo micelial del testigo Ac superó el desarrollo de sus correspondientes TA. El efecto tóxico que tuvo el disolvente en el presente trabajo coincide con lo reportado por Vazquez-Nuñez *et al.* (2009) y Dutta *et al.* (2010) quienes encontraron que la adición de acetona en un suelo redujo la actividad microbiana (medida en biomasa y emisión de CO₂) durante los primeros siete días, en comparación con el testigo sin acetona, y que transcurrido el periodo de inhibición, los microorganismos se recuperaron a través del tiempo.

El efecto tóxico de los solventes orgánicos como la acetona sobre los microorganismos en suelo y agua es conocido (Stratton 1989, Satsuma *et al.* 2001), pero este efecto es temporal y siempre hay una recuperación (Jenkinson y Powlson 1976). Algunos microorganismos pueden

usar los solventes como fuente de carbono (Siller *et al.* 1996), e incluso, la acetona puede facilitar la biodisponibilidad de nutrientes en el medio (Yeomans y Bremner 1989). La respuesta de los hongos ante acetona fue medida por Field *et al.* (1992), encontrando que altas concentraciones de este solvente (100 y 200 mL L⁻¹) inhibieron completamente el desarrollo de hongos como *P. chrysosporium*, *Trametes* sp. y *Bjerkandera* sp.; sin embargo, a concentraciones de 10 mL L⁻¹ no hubo inhibición, e incluso la cepa *Bjerkandera* sp. mostró mayor producción de CO₂ con respecto al control, aunque esta cepa no utilizó la acetona como fuente de carbono. Es posible que en el presente trabajo, los hongos fueron inicialmente susceptibles al efecto tóxico de la acetona, pero después del periodo de adaptación (3 a 10 días) lograron tolerarla y usarla como fuente de carbono, superando el desarrollo del TA; sin embargo, es necesario realizar estudios específicos del efecto y estímulo del solvente sobre los hongos.

Los hongos de referencia *P. chrysosporium* y *Trametes versicolor* mostraron tolerancia a las diferentes concentraciones de EN, CRP, y ante 25 mg CTL L⁻¹; además, la cepa de referencia *Trichoderma koningii* también mostró tolerancia a los insecticidas. La capacidad de estas especies fúngicas como degradadoras de endosulfán, pentaclorofenol, isoproturón e hidrocarburos poliaromáticos (HPA) ha sido demostrada (Dhawale *et al.* 1992, Rüttimann-Johnson y Lamar 1997, Kim *et al.* 2001, Wirén-Lehr *et al.* 2001).

La cepa K12P (*Fusarium moniliforme*) presentó buena tolerancia a EN y excelente recuperación ante CRP, sin embargo, se vio inhibida por CTL. Las respuestas del género *Fusarium* ante plaguicidas como EN, CRP y CTL ha sido poco estudiada, aunque se tienen reportes sobre su tolerancia, degradación y acumulación de compuestos tóxicos como trifluralina, atrazina, glifosato, lindano, e HPA (Jeffery y Burgess 1990, Yu *et al.* 1988, Verdin *et al.* 2005, Sagar y Sing 2011).

Las cepas *Mucor circinelloides* (K14S) y *Penicillium janthinellum* (K8S) mostraron excelente tolerancia ante EN, CRP, y buena recuperación ante CTL. Estos géneros fúngicos tienen capacidad para tolerar y degradar plaguicidas como la atrazina, o bien creosota e HPA (Kaufman y Blake 1970, Atagana 2004, Silva-Jiménez y Zazueta-Sandoval 2005, Dan *et al.* 2006, Kim y Lee 2007, Kataoka *et al.* 2010); no obstante, existe poca información sobre su tolerancia y degradación de EN, CRP y CTL. Con respecto al género *Alternaria* (K11TP), la información prácticamente es nula, por lo que la presente investigación contribuye en la generación de información básica de este género fúngico, en lo que respecta a su tolerancia a estos tres plaguicidas.

5.5 CONCLUSIONES

Las cepas fúngicas evaluadas mostraron diferentes grados de tolerancia ante endosulfán (EN), clorpirifós (CRP) y a la dosis más baja de clorotalonil (CTL). Estos plaguicidas causaron mayor inhibición del desarrollo micelial durante los primeros tres días, pero las cepas mostraron una recuperación gradual. El fungicida CTL provocó la mayor inhibición en las cepas; en contraste, las cepas expuestas a CRP se recuperaron totalmente a los 18 días. El EN inhibió el crecimiento de algunas cepas hasta el día 18, aunque en porcentajes más bajos que los encontrados con CTL. Las cepas de referencia *Phanerochaete chysosporium*, *Trametes versicolor* y *Trichoderma koningii*, así como las cepas K14S (*Mucor circinelloides*), K8S (*Penicillium janthinellum*), K11TP (*Alternaria alternata*) y K12P (*Fusarium moniliforme*), mostraron tolerancia a EN (1000, 2000 y 3000 mg L⁻¹), CRP (100, 250, 500, 1000 y 2000 mg L⁻¹) y CTL (25 mg L⁻¹). Estas siete cepas, tienen potencial para ser evaluadas en su capacidad para biodegradar plaguicidas.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Se obtuvieron 13 cepas de hongos filamentosos no ligninolíticos, de la paja de trigo molida se aislaron siete cepas, cuatro de suelo agrícola y dos de trozos de paja de trigo. Las cepas K1P y K9P fueron afines a *Fusarium proliferatum* mientras que las cepas K2P y K13P se identificaron como *F. succisae*. Para las cepas K8P, K12P, K14P y K3TP las secuencias indicaron afinidad con *F. moniliforme* mientras que las cepas K1S y K11S se identificaron como *F. oxysporum* y *F. equiseti*, respectivamente. La cepa K8S se identificó como *Penicillium janthinellum*, K14S como *Mucor circinelloides*, y la cepa K11TP correspondió a *Alternaria alternata*. Las cepas aisladas y las tres cepas de referencia (PC, TRI y TV) mostraron diferentes grados de tolerancia a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil.

Los insecticidas EN y CRP tuvieron un efecto adverso sobre el desarrollo micelial de las cepas en estudio los primeros tres días, después de este periodo de adaptación las cepas se recuperaron gradualmente. Las cepas PC, TRI, TV y K14S destacaron por su recuperación total mientras que K8S y K12P mostraron muy buena recuperación ante los plaguicidas. La cepa K11TP se caracterizó por presentar mejor desarrollo micelial ante las dosis bajas y medias de los insecticidas. El fungicida CTL, causó los mayores porcentajes de inhibición en todas las cepas durante los bioensayos; sin embargo, varias cepas (K8S, K14S, K11TP, PC y TV) se recuperaron en su totalidad en las dosis baja y media de este fungicida.

El solvente acetona inhibió ligeramente el desarrollo micelial de la mayoría de las cepas en los primeros 3 a 5 días, pero todas lograron superar el periodo de adaptación al solvente e incluso presentaron mejor desarrollo micelial que el TA. Este comportamiento ocurrió también con varias cepas ante EN y CRP, cepas como PC, TRI, K14S, K11TP y K12P presentaron mejor desarrollo

micelial ante 3000 mg L^{-1} de EN que a dosis menores y el TA, y con CRP este comportamiento fue más notorio con K12P, K1S y K3TP. Este estímulo en el aumento del desarrollo micelial sugiere que las cepas pudieron emplear los plaguicidas como fuente de carbono.

De los trece aislamientos obtenidos en esta investigación las cepas K14S y K8S destacaron por su buena recuperación y desarrollo ante los tres plaguicidas estudiados (EN, CRP y CTL), mostrando comportamientos similares a las cepas de referencia PC, TRI y TV, por lo que son excelentes cepas fúngicas para ser empleados en procesos de biorremediación de plaguicidas.

LITERATURA CITADA

- Albert L.A. 2005. Panorama de los plaguicidas en México. Revista de toxicología en línea (retel) <http://www.sertox.com.ar/retel/n08/01.pdf>. Consultado el 30 Octubre 2012.
- Adam-Ali T.A., Wainwright M. 1994. Growth of *Phanerochaete chrysosporium* in soil and its ability to degrade the fungicide benomyl. *Bioresource Technol.* 49: 197-201.
- Alegria H.A., Wong F., Jantunen L.M., Bidleman T.F., Figueroa M.S., Gold B.G., Ceja M.V., Waliszewski S.M, Infanzon R. 2008. Organochlorine pesticides and PCBS in air of southern Mexico (2002-2004). *Atmos Environ.* 42: 8810-8818.
- Alleman B.C., Logan B.E., Gilbertson R.L. 1993. A rapid method to screen fungi for resistance to toxic chemicals. *Biodegradation.* 4: 125-129.
- Alletto L., Coquet Y., Benoit P., Heddadj D., Barriuso E. 2010. Tillage management effects on pesticide fate in soils: A review. *Agron Sustain Dev.* 30: 367-400.
- Alexander M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation.* 2ª edición. Academic Press. San Diego, USA. 453 pp.
- Almeida G.G., Nat N., Tamie M.S. 2012. Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. *Cytologia.* 77: 3-9.
- Argumedo-Delira R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Almaraz J.J., Peña-Cabriaes J.J. 2012. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *J Environ Manage.* 95: S291-S299.

- Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C. García-Río L. 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agr Ecosyst Environ.* 123:247-260.
- Aston L.S., Seiber J.N. 1997. Fate of summertime airborne organophosphate pesticide residues in the Sierra Nevada Mountains. *J Environ Qual.* 26: 1483-1492.
- Atagana H.I. 2004. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World J Microb Biot.* 20: 851- 85.
- Atterby H., Smith N., Chaudhry Q., Stead D. 2002. Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminates environments. *Pesticide Outlook.* 2:9-13.
- Awasthi N., Ahuja R., Kumar A., 2000. Factors influencing the degradation of soil-applied endosulfan Isomers. *Soil Biol Biochem.* 32:1697-1705.
- Ballschmiter K., Hackenberg R., Jarman W.M., Looser R. 2002. Man-made chemicals found in remote areas of the world: the experimental definition for POPs. *Environ Sci Pollut Res.* 9: 274-288.
- Barragán-Huerta B.E., Costa-Pérez C., Peralta-Cruz J., Barrera-Cortés J., Esparza-García F., Rodríguez-Vázquez R. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean Coffe. *Int Biodeter Biodegr.* 59: 239-244.
- Bassil K.L., Vakil C., Sanborn M., Cole D.C., Kaur J. S., Kerr K.J. 2007. Cancer health effects of pesticides. *Can Fam Physician.* 53: 1704-1711.
- Bastos A.C., Magan N. 2009. *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *Int Biodeter Biodegr.* 63:389-394.
- Bayona J.M., Albaigés J. 2006. Sources and fate of organic contaminants in the marine environment. *Hdb Env Chem.* 2: 323-370.

- Behrooz R.D., Esmaili-Sari A., Ghasempouri S.M., Bahramifair N., Hosseini S.M. 2009. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl in feathers of resident and migratory birds of south-west Iran. *Arch Environ Con Tox.* 56:803-810.
- Bejarano F. 2002. *La Espiral del veneno: Guía crítica ciudadana sobre plaguicidas.* RAPAM, Texcoco, México. 226 p.
- Bhalerao T.S., Puranik P. R. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *Int Biodeter Biodegr.* 59:315- 321.
- Blanco C.A., Bernal J.S. 2003. Insecticidas y control biológico. *In: Bases para el manejo racional de insecticidas.* Silva-Aguayo G., Hepp-Gallo R. (eds.). Editorial Trama impresores Chillán, Chile. pp. 69-86.
- Bohmont B.L. 2007. *The standard pesticide user's guide.* 7a ed. Editorial Pearson Prentice Hall. New Jersey, USA. 425p.
- Bortoluzzi E.C., Rheinheimer D.S., Gonçalves C.S., Pellegrini B.R., Maroneze A.M., Kurz M.H.S., Bacar N.M., Zanella R. 2007. Investigation of the occurrence of pesticide residues in rural wells and surface water following application to tobacco. *Quim Nova.* 30: 1872-1876.
- Boxall A.B.A., Sinclair C.J., Fenner K., Kolpin D., Maud S.J. 2004. When synthetic chemicals degrade in the environment. *Environ Sci Technol.* 38:368a-375a.
- Broomhall S., Shine R. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Arch Environ Con Tox.* 45: 221-226.
- Burrows H.D., Canle L.M., Santaballa J.A., Steenken S. 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *J Photoch Photobio B.* 67:71- 108.
- Cabuk A., Taspınar U.A., Kolankaya N. 2006. Biodegradation of cyanide by a white rot fungus, *Trametes versicolor*. *Biotechnol Lett.* 28:1313-1317.

- Cai W., Li J., Zhang Z. 2007. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *Journal of Hazardous Materials*. 148: 38–42
- Campagna A.F., Eler M.N., Espíndola E.L.G., Senhorini J.A., doRego R.F., Silva L.O.L. 2007. Dimethoate 40% organosphosphorous pesticide toxicity in *prochilodus lineatus* (prochilodontidae, characiformes) eggs and larvae. *Braz J Biol*. 66: 633-640.
- Carlile B. 2006. Pesticides selectivity, health and environment. Cambridge University Press. 310 pp.
- Carlo-Rojas Z., Bello-Mendoza R., Figueroa M. S., Sokolov M. 2004. Chlorothalonil degradation under anaerobic conditions in an agricultural tropical soil. *Water Air Soil Poll.*151: 397-409.
- Carpenter S., Chair, Caraco N.F., Correll D.L., Howarth R.W., Sharpley A.N., Smith V.H. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Issues in Ecology*. 3. <http://esa.sdsc.edu/>. Consultado en Noviembre 2013.
- Carvalho M.B., Tavaresa S., Medeiros J., Núñez O., Gallart-Ayala H., Leitao M. C., Galceran M.T., Hursthouse A., Pereira C.S. 2011. Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation-reduction reactions. *Journal of Hazardous Materials*. 198: 133-142.
- Casadei D.G. 2003. Breve historia de los Insecticidas. *In: Bases para el manejo racional de insecticidas*. Silva-Aguayo G., Hepp-Gallo R. (eds.). Editorial Trama impresores. Chillán, Chile. pp. 19-28.
- Casida J.E., Quistad G. B. 2004. Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. *J Pestic Sci*. 29: 81-86.
- Castillo MDP., Torstensson L. 2007. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. *J Agric Food Chem*. 55: 5725-5733.

- Castillo MDP., Torstensson L., Stenström J. 2008. Biobeds for environmental protection from pesticide uses: A Review. *J Agric Food Chem.*56: 6206-6219.
- Cerniglia C., Sutherland J.B. 2001. Pesticide degradation. *In: Fungi in Bioremediation.* Gadd G.M. (ed.). Cambridge. United Kingdom. pp: 136-187.
- Chai W., Handa Y., Suzuki M., Saito M, Kato N., Akira H. C. 2005. Biodegradation of bisphenol a by fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 120: 175-182.
- Chaudhry Q., Schröder P., Werck-Reichart D., Grajek W., Marecik R. 2002. Prospects and limitations of phytoremediation for removal of persistent pesticides in the environment. *Environ Sci Pollut Res.* 9:4-17.
- Chaudhry Q., Blom-Zandstra M., Gupta S., Joner E.J. 2005. Utilising the synergy between plant and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ Sci Pollut Res.* 12:34-48.
- Chaves A., Shea S., Danehower D. 2008. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. *Chemosphere.* 71:629-638.
- Chirnside A.E.M., Ritter W.F., Radosevich M. 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biol Biochem.* 39:3056-3065.
- Chopra A.K., Kumar S M., Chamoli S. 2011. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system: an overview. *Environ Monit Assess.* 173:905-916.
- Christensen K., Harper B., Luukinen B., Buhl K., Stone D. 2009. Chlorpyrifos technical fact sheet. national pesticide information center (NPIC). Oregon State University Extension Services. <http://npic.orst.edu/factsheets/chlorpotech.pdf>. Consultado en Octubre 6 2012.

- CICOPLAFEST. 2004. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas (CICOPLAFEST). México. 483 pp.
- Coppola L., Castillo M.P, Monaci E., Vischetti C. 2007. Adaptation of the biobed composition for clorpirifos degradation to southern Europe conditions. *J Agric Food Chem.* 55:396-401.
- Daam M.A., Van den Brink P.J. 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. *Ecotoxicology.* 19:24-37.
- Dan S., Pei-jun L., Stagnitti F., Xian-zhe X. 2006. Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *J Environ Sci.* 18: 1204-1209.
- Das A.C., Mukherjee D. 2000. Soil application of insecticides influences microorganisms and plant nutrients. *Appl Soil Ecol.* 14: 55- 62.
- Dasgupta S, Meisner C., Wheeler D., Xuyen K., Lam N.T. 2007. Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam. *Int J Hyg Environ Health.* 210: 12-32.
- Dhananjayan V., Muralidharan S. 2010. Organochlorine pesticide residues in inland wetland fishes of Karnataka, India and their implications on human dietary intake. *B Environ Contam Tox.* 85:619-623.
- Dhawale S.W., Dhawale S.S., Dean-Ross D. 1992. Degradation of phenantrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well nonligninolytic conditions. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3000-3006.
- Díaz G., Ortiz R., Shettino B., Vega S., Gutiérrez R. 2009. Organochlorine pesticides residues in bottled drinking water from Mexico City. *B Environ Contam Tox.* 82:701-704.

- Diez M.C. 2010. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. *J Soil Sci Plant Nutr.* 10: 244-267.
- Dutta M., Sardar D., Pal R., Kole R.K. 2010. Effect of chlorpyrifos on microbial biomass and activities in tropical clay loam soil. *Environ Monit Assess.* 160:385-391.
- Eisenhauer N., Klier M., Partsch S., Sabais A.C.W., Scherber C., Weisser W.W., Scheu S. 2009. No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. *Appl Soil Ecol.* 42: 31-36.
- Enjarlis, Ratnawati. 2011. Kinetics and identification of products degradation of endosulfan in a solution of carbofuran by hydrolysis, ozonation with and without activated carbon. *International Journal of Chemical Engineering and Applications.* 2: 42-46.
- Ennaceur S., Rhida-Driss M. 2012. Time course of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in breast-feeding mothers throughout the first 10 months of lactation in Tunisia. *Environ Monit Assess.* 185:1977-1984.
- Escobar V.M., Nieto M.G., Sánchez J.E. Cruz Y.L. 2002. Effect of endosulfan on mycelial growth of *Pleurotus ostreatus* and *Auricularia fuscusuccinea* in liquid culture. *In: Mushroom Biology and Mushroom Products.* Sánchez (ed.). UAEM. México.
- Fang H., Xiang Y.Q., Hao Y.J., Chu X.Q., Pan X.D., Yu J.Q., Yu Y.L. 2008. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium sp.* DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *Int Biodeter Biodegr.* 61: 294- 303.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2003. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas, Artículo 2. Versión revisada, Adoptado por el 123º periodo de sesiones del Consejo de la FAO, Noviembre 2002. Roma. http://www.chem.unep.ch/DDT/documents/ICOC_es1.pdf. Consultado en Abril 30 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization). 2011. Documento de orientación para la adopción de decisiones, endosulfán. Convenio de Rotterdam, aplicación del procedimiento de consentimiento fundamentado previo a productos químicos prohibidos o rigurosamente restringidos. Junio 2011, Rotterdam.

http://www.pic.int/Portals/5/DGDs/DGD_Endosulfan_ES.pdf. Consultado en abril 30 2013.

Fernández-Bringas L.M, Ponce-Vélez G., Calva B. L G, Salgado-Ugarte I.H., Botello A. V., Díaz G.G. 2008. Organochlorine pesticides in lacustrine sediments and tilapias of Metztitlan, Hidalgo, Mexico. *Rev Biol Trop.* 56: 1381-1390.

Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N.G., Poggi-Varaldo H.M., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R.O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 48: 179-187.

Fewson C. A. 1988. Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Tib Tech.* 6:148-153.

Field J.A., De Jong E., Costa G.F., De Bont J.A.M. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl Environ Microbiol.* 58:2219-2226.

Fogg P., Boxall A., Walker A. 2001. Biobeds: The development and evaluation of a biological system for the disposal of pesticide waste and washings. Cranfield Centre for Ecochemistry. Cranfield University. [Http://Cranfield.Ac.Uk/Ecochemistry/](http://Cranfield.Ac.Uk/Ecochemistry/). Consultado en Abril 29 2013.

Fragoero S., Magan N. 2008. Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* on differential breakdown of pesticide mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. *Int Biodeter Biodegr.* 62: 376-383.

- García A.R., Fleite S.N., Vazquez-Pugliese D., De Iorio A. F. 2013. Feedlots and pollution: A growing threat to water resources of agro-production zone in Argentina. *Environ Sci Technol.* 47: 11932-11933.
- García-De la Parra, J. Cervantes-Mojica, C. González-Valdivia. F. J. Martínez-Cordero, G. Aguilar-Zárate, P. Bastidas-Bastidas and M. Bentacourt-Lozano. 2012. Distribution of pesticides and pcbs in sediments of agricultural drains in the Culiacan Valley, Sinaloa, Mexico. *Arch Environ Con Tox.* 63:323-336.
- Gebremariam S.Y., Beutel M.W., Yonge D.R., Flury M., Harsh J.B. 2012. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *In: Rev Environ Contam Toxicol.* Whitacre D.M. (ed.) 123-175 p.
- Gil Y., Sinfort C., Brunet Y., Poveche V., Bonicelli B. 2007. Atmospheric loss of pesticides above an artificial vineyard during air-assisted spraying. *Atmos Environ.* 41: 2945-2957.
- Gisi U., Sierotzki H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur J Plant Pathol.* 122:157-167.
- Goswami S., K. Vig y D. K. Singh. 2009. Biodegradation of α and β endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere* 75: 883–888.
- Greene S.A., Pohanish R. 2005. Sittig's handbook of pesticides and agricultural chemicals. William Adrew Publishing. N. Y. USA. 1189 p.
- Grube A., Donaldson D., Kiely T., Wu L. 2011. Pesticide industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates. Biological and Economic Analysis Division. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. U. S. Environmental Protection Agency. Washington, D C 20460.
- http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/07pestsales/market_estimates2007.pdf. Consultado en Octubre 82012.

- Guillén Y., Navias D., Machuca A. 2009. Tolerance to wood preservatives by cooper- tolerant wood-rot fungi native to south-central chile. *Biodegradation*. 20:135-142.
- Gupta P.K. 2004. Pesticide exposure-Indian scene. *Toxicology*. 198: 83-90.
- Hangler M., Jensen B., Ronhede S., Sorensen S.R. 2007. Inducible hydroxylation and demethylation of the herbicide isoproturon by *Cunninghamella elegans*. *FEMS Microbiol Lett*. 268: 254-260.
- Harvey P.J., Thurston C.F. 2001. The biochemistry of ligninolytic fungi. *In Fungi in Bioremediation*. Gadd G.M. (ed.). Cambridge. United Kingdom. pp: 27-51.
- Hernández-Antonio A., Hansen A.M. 2011. Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev Int Contam Ambie*. 27: 115-127.
- Herrero-Mercado M., Waliszewski S.M., Valencia-Quintana R., Caba M., Hernández-Chalate F., García-Aguilar E., Villalba R. 2010. Organochlorine pesticide levels in adipose tissue of pregnant women in Veracruz, Mexico. *B Environ Contam Tox*. 84:652-656.
- Hewitt H.G. 1998. Fungicides in crop protection. CAB International London, UK. 221 pp.
- Hu D., Henderson K., Coats J. 2009. Fate of transformation products of synthetic chemicals. *Hdb Env Chem*. 2: 104-120.
- Hussain S., Arshad M., Saleem M., Khalid A. 2007a. Biodegradation of α and β endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation*. 18:731-740.
- Hussain S., Arshad M., Saleem M., Ahmad Z. Z. 2007b. Screening of soil fungi for in vitro degradation of endosulfan. *World J Microb Biot*. 23:939-945.
- IPCS (International program of chemical safety). 2002. The WHO recommended classification of pesticides by hazards and guidelines to classification, 1990-1991. Geneva. <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/a76526.pdf>. Consultado en Octubre 14 2012.

- Jauregui J., Valderrama B., Albores A., Vazquez-Duhalt R. 2003. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation*. 14: 397-406.
- Jayashree R., Vasudevan N. 2007. Persistence and distribution of endosulfan under field condition. *Environ Monit Assess*. 131: 475-478.
- Jeffery S. y L. W. Burgess. 1990. Growth of *Fusarium graminearum* Schwabe Group 1 on media amended with atrazine, chlorsulfuron or glyphosate in relation to temperature and osmotic potential. *Soil Biol. Biochem*. 22: 665- 670.
- Jenkinson D.S., Powlson D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V: a method for measuring soil biomass. *Soil Biol Biochem*. 8:209-213.
- Kamei I., Takagi K., Kondo R. 2011. Degradation of endosulfan and endosulfan-sulfate by white-rot fungus *Trametes hirsutum*. *J. Wood Sci*. 57: 317-322.
- Karas P.A., Perruchon C., Exarhou K., Ehaliotis C., Karpouzas D.G. 2011. Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. *Biodegradation*. 22:215-228.
- Karanasios E., Tsiropoulos N.G., Karpouzas D.G. 2012. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*. 23:787-802.
- Kataoka R., Takagi K., Kamei I., Kiyota H., Sato Y. 2010. Biodegradation of dieldrin by a soil fungus isolated from a soil with annual endosulfan applications. *Environ. Sci. Technol*. 44, 6343-6349
- Katayama A., Matsumura F. 2009. Degradation of organochlorine pesticides, particularly endosulfan, by *Trichoderma harzianum*. *Environmental toxicology and Chemistry*. DOI: 10.1002/etc.5620120612

- Kaufman D. D., J. Blake. 1970. Degradation of atrazine by soil fungi. *Soil Bid. Biochem.* 2: 73-80.
- Kaushik C.P., Sharma H.R., Gulati D., Kaushik A. 2011. Changing patterns of organochlorine pesticide residues in raw bovine milk from Haryana, India. *Environ Monit Assess.* 182:467-475.
- Kerle E.A., Jenkins J.J., Vogue P.A. 2007. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State University, Extension Service. 1-7. EM 8561-E.
<http://extension.oregonstate.edu/catalog/pdf/em/em8561-e.pdf>. Consultado en Octubre 16 2012.
- Kesavachandran C.N., Fareed M., Pathak M.K., Biahari V., Mathur N., Srivastava A.K. 2008. Adverse health effects of pesticides in agrarian populations of developing countries. *In: Rev Environ Contam Toxicol.* Whitacre D.M. (ed.). 200: 33-52.
- Kim J.D., Lee C.G. 2007. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungi co-cultures. *Biotechnol Bioproc E.* 12: 412-416.
- Kim J.R., Ahn Y.J. 2009. Identification and characterization of chlorpyrifos-methyl and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading *Burkholderia sp.* strain KR100. *Biodegradation.* 20:487-497.
- Kim, Y.K., Kim S.H., Choi S.C. 2001. Kinetics of endosulfan degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Lett.* 23: 163-166.
- Koul O. 1999. Insect growth regulating and antifeedant effects of neem extracts and azadirachtin on two aphid species of ornamental plants. *J. Biosci.* 24: 85-90.
- Kulkarni M., Chaudhari A. 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J Environ Manage.* 85:496-512.

- Kullman S.W., Matsumura F. 1996. Metabolic pathway utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of the cyclodiene pesticide edosulfan. *Appl Environ Microbiol.* 62:593-600.
- Kulshrestha G, Kumari A. 2011. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium sp.* Strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biol Fertil Soils.* 47:219-225.
- Kumar M., Lakshmi C.V., Khanna S. 2008. Microbial biodiversity and in situ bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Indian J Microbiol.* 48:128-133.
- Kumar M., Philip L. 2006. Endosulfan mineralization by bacterial isolates and possible degradation pathway identification. *Bioremediation Journal.* 10:179-190.
- Kumari D. K. Fulekar M. H. 2012. Chlorpyrifos bioremediation in *Pennisetum* rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1715-1725.
- Kumari B., Madan V.K., Kathpal T.S. 2008. Status of insecticide contamination of soil and water in Haryana, India. *Environ Monit Assess.* 136:239-244.
- Kwon G.S., Sohn H.Y., Shin K.S., Kim E., Seo B.I. 2005. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 845-850.
- Lagunes-Tejeda A., Villanueva-Jiménez J.A. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 264 pp.
- Lakshmi C.V., Kumar M., Khanna S. 2008. Biotransformation of chlorpyrifos and bioremediation of contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr.* 62: 204-209.
- Launen L.A., Pinto L.J., Percival P.W., Lam S.F.S., Moore M.M. 2000. Pyrene is metabolized to bound residues by *Penicillium janthinellum* SFU403. *Biodegradation.* 11: 305-312.

- Lee S.E., Kim J.S., Kennedy I.R., Park J.W., Kwon G.S., Koh S.C., Kim J.E. 2003. Biotransformation of an organochlorine insecticide endosulfan by *Anabaena* species. *J Agric Food Chem.* 51:1336-40.
- Leslie J.F., Summerell B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell publishing. 388pp.
- Li Y.F., Macdonald R.W. 2005. Sources and pathways of selected organochlorine pesticides to the Arctic and the effect of pathway divergence on HCH trends in biota: A review. *Sci Total Environ.* 342: 87-106.
- Li X., Jiang J., Gu L., Ali S. W., He J., Li S. 2008. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. *Int Biodeter Biodegr.* 1-5.
- Liu X., You M. S., Wei Y. Z. Cai Z. C., Liao J. Y. 2002. Degradation effects of *Trichoderma* Y on chlorpyrifos and methamidofos. *J Fujian Agric Forestry Univ.* 31: 455-458.
- Linde D.C. 1994. Physico-chemical properties and environmental fate of pesticides. Environmental protection agency (EPA). Department of Pesticide Regulation. Environmental Monitoring and Pest Management Branch. 1020 N Street, Sacramento, CA. 95814. EH 94-03. <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/eh9403.pdf>. Consultado en Octubre 16 2012.
- Litchfield M.H. 1996. Environmental health criteria: 183, Chlorothalonil. World Health Organization (WHO). Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc183.htm>. Consultado en Octubre 16 2012.
- López C.F, Obiols J., Subías P.J. 1998. Plaguicidas agrícolas y salud. *In: Plaguicidas: Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*. Morell I., Candela L. (eds.). pp 273-295.
- López-Pérez G.C., Arias-Estévez M., López-Periago E., Soto-González B., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J. 2006. Dynamics of pesticides on potato crops. *J Agric Food Chem.* 54:1797-1803.

- Mallick K., Bharati K., Banerji A., Shakil N. A., Sethunathan N. 1999. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure cultures and in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:48-54
- Maloney, A.E. 2001. Pesticide degradation. *In: Fungi in Bioremediation.* Gadd G.M. (ed.). Cambridge. United Kingdom. pp: 188-223.
- Mancera-López M.E., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortés J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int Biodeter Biodegr.* 61:151-160.
- Marinozzi M., Coppola L., Monaci E., Karpouzas D.G., Papadopoulou E., Menkissoglu-Spiroudi U., Vischetti C. 2012. The dissipation of three fungicides in a biobed organic substrate and their impact on the structure and activity of the microbial community. *Environ Sci Pollut Res.* 2:2546-2255.
- Masaphy S., Henis Y., Levanon D. 1996. Manganese-enhanced biotransformation of atrazine by the white rot fungus *Pleurotus pulmonarius* and its correlation with oxidation activity. *Appl Environ Microbiol.* 62:3587-3593.
- Matsubara M., Lynch J.M, De Leij F.A.A.M. 2006. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. *Enzyme Microb Tech.* 39: 1365-1372.
- Maya K., Upadhyay S.N., Singh R.S., Dubey S. K. 2012. Degradation kinetics of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) by fungal communities. *Bioresource Technology.* 126: 216–223.
- Mendoza Z.C. 2002. Fungicidas en Ornamentales. *In: Manejo fitosanitario de ornamentales.* Bautista, M. N., Alvarado J., Chavarín J.C., Sánchez H. (eds.). Colegio de Postgraduados. México. pp: 119-147.

- Miles J.R.W., Moy P. 1979. Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms. *B Environ Contam Tox.* 23:13-16.
- Mitra J, Mukherjee P. K., Kale S. P., Murthy N. B. K. 2001. Bioremediation of DDT in soil by genetically improved strains of soil fungus *Fusarium solani*. *Biodegradation.* 12: 235-245.
- Mitsukura K., Imoto T., Nagaoka H., Yoshida T., Nagasawa T. 2005. Regio- and stereo-selective hydroxylation of abietic acid derivatives by *Mucor circinelloides* and *Mortierella isabellina*. *Biotechnol Lett.* 27: 1305-1310.
- Moguin C., Pericaud C., Dubroca J., Asther M. 1997. Enhanced mineralization of lindane in soils supplemented with the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol Biochem.* 29: 1321-1324.
- Moorman, T.B. 1994. Pesticide degradation by soil microorganisms; environmental, ecological and management effects. *In Soil biology: effects on soil quality.* Hatfield, J. L., Stewart B.A. (eds.). Lewis Publishers. Florida, USA. 169 p.
- Motonaga K, Takagi K., Matumoto S. 1996. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. *Biol Fert Soils.* 23:340-345.
- Mukherjee I., Gopal M., Dhar D.W. 2004. Disappearance of chlorpyrifos from cultures of *Chlorella vulgaris*. *B Environ Contam Tox.* 73:358-363.
- Mukherjee I., Mittal. 2005. Bioremediation of endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Clamidosporium oxisporium*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 1034- 1040.
- Mulbury W., Kearny P.C. 1991. Degradation of pesticides by microorganisms and the potential for genetic manipulation. *Crop Protection.* 10:334-346.
- Müller K., Magesan G.N., Bolan N.S. 2007. A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil. *Agr Ecosyst Environ.* 120:93-116.

- Müncnerová D., Augustin J. 1994. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Bioresource Technol.* 48: 97-106.
- Navarro S., Vela N., Navarro G. 2007. Review: An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Span J Agric Res.* 5:357-375.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://ncbi.nlm.nih.gov/>. consultada en agosto de 2012.
- Omirou M., Dalias P., Costa C., Papastefanou C., Dados A., Ehaliotis C., Karpouzas D.G. 2012. Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environ Pollut.* 166:31-39.
- Önneby K., Jonsson A., Stenström J. 2010. A new concept for reduction of diffuse contamination by simultaneous application of pesticide and pesticide degrading microorganisms. *Biodegradation.* 21:21-29.
- Pandey S., Singh D.K. 2004. Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soil. *Chemosphere.* 55: 197-205.
- Pérez-Olvera M.A, Navarro-Garza H., Miranda-Cruz E. 2011. Use of pesticides for vegetable crops in Mexico, *Pesticides in the modern world-Pesticides use and management.* Stoytcheva M. (ed.). pp: 98-119. http://cdn.intechopen.com/pdfs/21981/InTech-Use_of_pesticides_for_vegetable_crops_in_mexico.pdf. Consultado en Abril 27 2013.
- Plimmer J.R. 1992. Dissipation of pesticides in the environment. *In: Fate of pesticides and chemicals in the environment.* Schonoor J.L. (ed.). John Wiley and Sons, Inc. New York. pp. 79-90.
- Purnomo A.S., Mori T., Kamei I., Kondo R. 2011. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review. *Int Biodeter Biodegr.* 65: 921-930.

- Querejeta G.A., Ramos L.M., Flores A.P., Hughes E.A., Zalts A., Montserrat J.M. 2012. Environmental pesticide distribution in horticultural and floricultural periurban production units. *Chemosphere*. 87: 566-572.
- Racke K.D. 1993. Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol*. 13:1-150.
- Rafin C., Veignie E., Fayeulle A., Surpateanu G. 2009. Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresource Technol*. 100: 3157-3160.
- Rajashekara H.M., Manonmani H.K. 2007. Aerobic degradation of technical hexachlorocyclohexane by a defined microbial consortium. *J Hazard Mater*. 149:18-25.
- Ramírez-Gama R. M., Luna-Millán B., Mejía-Chávez A., Velázquez-Madrado O., Tzusuki-Reyes G., Vierna-García L., Hernández-Gómez L., Müggenburg I. 1998. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química, UNAM. México. 300 pp.
- Ramírez J.A., Lacasaña M. 2001. Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología y Medición de la Exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*. 4(2):67-75.
- Rand G.M., Carriger J.F., Gardinali P.R., Castro J. 2010. Endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, in freshwater ecosystems of South Florida: a probabilistic aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicology*. 19:879-900.
- Rao D.M.R., Murty A. S. 1980. Persistence of endosulfan in soils. *J Agric Food Chem*. 28:1099-1101.
- Regitano J.B., Tornisiello V.L., Lavorenti A., Pacovsky R.S. 2001. Transformation pathways of 14C-chlorothalonil in tropical soils. *Arch Environ Con Tox*. 40:295-302.
- Richards, F.J. 1959. A flexible growth function for empirical use. *J Exp Bot*. 10: 290-300.

- Riddle R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*. 42: 265-270.
- Roca E., D'Errico E., Izzo A., Strumia S., Esposito A., Fiorentino A. 2009. In vitro saprotrophic basidiomycetes tolerance to pendimethalin. *Int Biodeter Biodegr*. 63: 182-186.
- Romero-Torres T. 2008. Technical assistance to facilitate action on the implementation of the Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs): Obsolete POPs pesticides. SEMARANT-UNIDO (United Nations Industrial Development Organization. http://siscop.ine.gob.mx/descargas/proyectos/final_report_en_teresita_romero.pdf?projID=2451. Consultado en Octubre 16 2012.
- Rosell G., Quero C., Coll J., Guerrero A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *J Pestic Sci*. 33: 103-121.
- Rüttimann-Johnson C., Lamar R.T. 1997. Binding on pentachlorofenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. *Soil Biol. Biochem*. 29:1143-1148.
- Safe S.H. 2000. Endocrine disruptors and human health, is there a problem?: An Update. *Environ Health Perspect*. 108: 487-493.
- Sagar V., Singh D.P. 2011. Biodegradation of lindane pesticide by non white- rots soil fungus *Fusarium* sp. *World J Microb Biot*. 27:1747-1754.
- Saien J., Khezrianjoo. S. 2008. Degradation of the fungicide carbendazim in aqueous solutions with UV/TiO₂ process: Optimization, kinetics and toxicity studies. *Journal of Hazardous Materials*. 157: 269–276
- Sambrook J., Russel D. W. 2001. *Molecular cloning; A laboratory manual*. 3th edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1:1.32-1.34.

- Sardar D., Kole R.K. 2005. Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients in soil. *Chemosphere* 61: 1273-1280.
- SAS (Statistical Analysis System Institute). 2002. Users's guide: Statics, Version 8.0. SAS. Institute, Inc. Cary. N. Y.
- Sasikala C., Jiwal S. Rout P., Ramya M. 2012. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1301-1308.
- Satsuma K., Nakamura H., Sato K., Kato Y. 2001. A negative effect of co-solvent on atrazine biodegradation in experimental river microcosms. *Microbes Environ.* 16:185-189.
- Satsuma K., Kameshiro M., Hayashi O., Sato K., Kato Y. 2006. Characterization of a *Nocardioides* based, atrazine-mineralizing microbial colony isolated from Japanese riverbed sediment. *J Pestic Sci.* 31: 420-423.
- Segura-Miranda A. 1985. Plaguicidas agrícolas, una introducción a su conocimiento. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México. 360 pp.
- Seiber J.N. 2002. Environmental fate of pesticides. *In: Pesticides in Agriculture and the Environment.* Wheeler, W.B. (ed.). Dekker Inc. USA. pp: 127- 161.
- Selvi C., Paramasivam M., Rajathi D.S., Chandrasekaran S. 2012. Multiresidue analysis of organochlorine pesticides in milk, egg and meat by GC-ECD and confirmation by GC-MS. *B Environ Contam Tox.* 89:1051-1056.
- SENER (Secretaría de Energía). 2008. Anuario Estadístico de la Industria Petroquímica 2007. Dirección General de Información y Estudios Energéticos. México. http://www.sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/Anuario%20Estadistico%202007.pdf. Consultado en Octubre 16 2012.

- Sethunathan N., Megharaj M., Chen Z.L., Williams B.D., Lewis G., Naidu R. 2004. Algal degradation of known endocrine disrupting insecticide, α -endosulfan, and its metabolite, endosulfan- sulphate, in liquid medium and soil. *J Agric Food Chem.* 52:3030-3035.
- Shafiani S., Malik A. 2003. Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater irrigated soil. *J Microbiol Biotechn.* 19: 897-901.
- Shi X.Z., Guo R.J., Miao Z.Q., Li S.D. 2011. Chlorothalonil degradation by *Ochrobactrum lupini* strain TP-D1 and identification of its metabolites. *World J Microb Biot.* 27:1755-1764.
- Siddique T., Okeke B. C., Arshhad M., Frankenberger W. T. Jr. 2003. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms. *J. Environ. Qual.* 3, 47-54.
- Siller H., Rainey F.A., Stackebrandt E., Winter J. 1996. Isolation and characterization of a new gram-negative, acetone-degrading, nitrate-reducing bacterium from soil *Paracoccus solventivorans* sp nov. *Int J Syst Bacteriol.* 46:1125-1130.
- Silva-Jiménez H., R. Zazueta- Sandoval. 2005. Intracellular Fate of Hydrocarbons: Possible Existence of Specific Compartments for Their Biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2005:121. 124.
- Simmons E. G. 2007. *Alternaria: An identification manual.* CBS Fungal Biodiversity Centre. Netherlands. pp 582-587.
- Singh, B.K., Walker A., Wright D.J. 2002. Persistence of chlorpyrifos, fenamiphos, chlorothalonil and pendimethalin in soil and their effects on soil microbial characteristics. *B Environ Contam Tox.* 69: 181-188.
- Singh B.K., Walker A., Wriugh D. 2005. Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soil: Dependence on structural similarity of compounds. *Soil Biol Biochem.* 37: 1675-1682.

- Singh, B.K., Walker A., Wrigth D.J. 2006. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biol Biochem.* 38: 2682-2693.
- Singh D.K. 2008. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. *Indian Journal of Microbiology.* 48: 35-40.
- Singh N. S., Singh D. K. 2011. Biodegradation of endosulfan and endosulfan sulfate by *Achromobacter xylosoxidans* strain C8B in broth médium. *Biodegradation.* 22:845–857
- Stahuljak B., Valic F. 1984. Environmental health criteria 40: Endosulfan. World Health Organization. Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc40.htm>. Consultado en Octubre 16 2012.
- Stenersen J. 2004. Chemical pesticides, mode of action and toxicology. Editorial CRC Press. New York, USA. 276 p.
- Stratton G.W. 1989. Effect of the solvent acetone on membrane integrity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull Environ Contam Tox.* 42:754-760.
- Su S., Zeng X., Bai L., Jiang X., Li L. 2010. Bioaccumulation and biovolatilisation of pentavalent arsenic by *Penicillin janthinellum*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma asperellum* under laboratory conditions. *Curr Microbiol.* 61:261–266
- Sutherland T.D., Weir K.M., Lacey M.J., Horne I., Russell R.J., Oakeshot J.G. 2002. Enrichment of a mixed culture capable of degrading endosulfate, the toxic metabolite of endosulfan. *J of Appl Microbiol.* 92:541-548.
- Suzuki S., Otani T., Iwasaki S., Ito K., Omura H., Tanaka Y. 2003. Monitoring of 15 pesticides in rainwater in Utsunomiya, eastern Japan, 1999-2000. *J Pestic Sci.* 28: 1-7.
- Szewczyk R., Dlugonski J. 2009. Pentachlorophenol and spent engine oil degradation by *Mucor ramosissimus*. *Int Biodeter Biodegr.* 63: 123-129.

- Tallur P.N., Megadi V.B., Kamanavalli C.M., Ninnekar H.Z. 2006. Biodegradation of p-cresol by *Bacillus sp.* strain PHN 1. *Curr Microbiol.* 53: 529-533.
- Tanabe S., Iwata H., Tatsukawa R. 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Sci Total Environ.* 154:163-177.
- Tang J., Liu L., Hu S., Chen Y., Chen J. 2009. Improved degradation of organophosphate dichlorvos by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Bioresource Technol.* 100: 480-483.
- Tillman R.W., Malcolm K.S., Long J.W. 1973. Mechanism of action and fate of the fungicide chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile) in biological systems 1, reactions with cells and subcellular components of *Saccharomyces pastorianus*. *Pestic Biochem Phys.* 3: 160-167.
- Torra-Reventós M., Yajima M., Yamanaka S., Kodama T. 2004. Degradation of the Herbicides thiobencarb, butachlor and molinate by a newly isolated *Aspergillus niger*. *J Pestic Sci.* 29: 214-216.
- Torstensson L., Castillo MDP. 1997. Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pest Outlook.* 8:24-27.
- Torstensson L. 2000. Experiences of biobeds in practical use in Sweden. *Pest Outlook.* 11:206-211.
- Ukai T., Itou T., Katayama A. 2003. Degradation of chlorothalonil in soils treated repeatedly with chlorothalonil. *J Pestic Sci.* 28:208-211.

USEPA (US Environmental Protection Agency). 1999. Fate and environmental risk assessment Chapter: Chlorpyrifos; Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC. 1999.

[http://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20\(SRCSD_OTHER\)/SRCSD_OTHER_R_024.pdf](http://marine.calpoly.edu/Weston/Sac%20Regional/03%20Other%20Reports%20(SRCSD_OTHER)/SRCSD_OTHER_R_024.pdf). Consultado en Abril 27 2013.

Van Maele-Fabry G., Lantin A., Hoet P., Lison D. 2010. Childhood leukemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Cause Control*. 21:787- 809.

Varsha Y. M, Naga Deepthi CH., Chenna S. 2011. An emphasis on xenobiotic degradation in environmental clean up. *J Bioremed Biodegrad* 2011, S11 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.S11-001>

Vassilev K., Kambourova V. 2006. Pesticides as global environmental pollutants. *In: Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats*. Simeonov L. and E. Chirila (eds.). pp 173-191.

Vazquez-Nuñez, E., Rodríguez V., García G. A., Luna-Guido M., Betancur-Galvis L. A., Marsh R., Dendooven L. 2009. Using acetone as solvent to study removal of anthracene in soil inhibits microbial activity and alters nitrogen dynamics. *Arch Environ Contam Toxicol*. 57:239-246.

Veignie E., Rafin C., Woisel P., Cazier F. 2004. Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environ Pollut*. 129: 1- 4.

Velázquez-Barrón M.A., Fuentes-Dávila G. 2009. Germinación de la semilla de cuatro variedades de trigo (*Triticum* spp. L.) *in vitro*. *Biotecnia*. 11: 12-24.

- Verdin A., Loune`s-Hadj Sahraoui A., Newsam R., Robinson G., Durand R. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut.* 133: 283-291.
- Vijgen J., Egenhofer C. 2009. *Obsolete pesticides a ticking time bomb and why we have to act now.* Brussels: Centre for European Policy Studies.
- Vijgen J., Abhilash P.C., Li Y., Lal R., Forter M., Torres J., Singh N., Yunus M., Tian C., Schäffer A., Weber R. 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs a global perspective on the management of lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res.* 18:152-162.
- Vijgen G.J., Aliyeva G., Weber R. 2012. The forum of the international HCH and pesticides association- a platform for international cooperation. *Environ Sci Pollut Res.* 20:2081-2086.
- Vischetti C., Monaci E., Cardinali A., Casucci C., Perucci P. 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere.* 72: 1739-1743.
- Waliszewski S.M., Caba M., Herrero-Mercado M., Saldariaga-Noreña H., Meza E., Zepeda R., Martínez-Valenzuela C., Gómez Arroyo S., Villalobos P.R. 2012. Organochlorine pesticide residue levels in blood serum of inhabitants from Veracruz, Mexico. *Environ Monit Assess.* 184:5613–5621.
- Wang D., Shelver W.L., Atkinson S., Mellish J., Li Q.X. 2010. Tissue distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and potential toxicity to Alaskan northern fur seals assessed using PCB´s congener specific mode of action schemes. *Arch Environ Con Tox.* 58:478-488.
- Wang G., Liang B., Li F., Li S. 2011. Recent advances in the biodegradation of chlorothalonil. *Curr Microbiol.* 63:450-457.

- Ware G.W. 1994. The pesticide book. 4th edition. Editorial Thomson publications. Fresno, CA. 386 p.
- Watanabe T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. 2nd edition. CRC Press. London. 486 pp.
- WHO (World Health Organization). 1990. Public Health impact of Pesticides Used in Agriculture. Geneva. ISBN:92-4-156139-4.
<http://whqlibdoc.who.int/publications/1990/9241561394.pdf>. Consultado en Octubre 26 2012.
- WHO (World Health Organization). 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: WHO. ISBN 92 4 154663 8.
http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class_2009.pdf. Consultado en Abril 2013.
- White T.J., Bruns T., Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols*. Innins M. A., Gelfan D. H., Sninsky J. H., White T. J. (eds), Academic Press. Pp. 315-322.
- Wirén-Lehr V., Castillo M.P., Scheunert S.I., Torstensson L. 2001. Degradation of isoproturon in biobeds. *Biology and Fertility of Soils*. 33:535-540.
- Xing Z., Chow L., Cook A., Benoy G., Rees H., Ernst B., Meng F., Li S., Zha T., Murohy C., Batchelor S., Hewitt L.M.. 2012. Pesticide application and detection in variable agricultural intensity watersheds and their river systems in the maritime region of Canada. *Arch Environ Con Tox*. 63:471-483.
- Yeomans J.C., Bremner J.M. 1989. Effects of organic solvents on denitrification in soil. *Biol Fert Soils*. 7:336-340.
- Yu S.M., Templeton G.E., Wolf D. C. 1988. Trifluralin concentration and the growth of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* in liquid medium and soil. *Soil Biol Biochem*. 0: 607-611.

- Yu Y. L., Fang H., Wang X., Wu X. M., Shan M., Yu J. Q. 2006. Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables. *Biodegradation*. 17: 487–494
- Zhang X.L., Lou X.J., Liu J., Lou Y., Chen S.J., Mai B.X. 2011. Polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides in birds from a contaminated region in South China: association with trophic level, tissue distribution and risk assessment. *Environ Sci Pollut Res*. 18:556-565.
- Zhang Y., Lu J., Wu L., Chang A., Frankenberger Jr W.T. 2007. Simultaneous removal of chlorothalonil and nitrate by *Bacillus cereus* strain NSI. *Sci Total Environ*. 382: 383-387.
- Zhang W.J., FuBin Jiang F.B., Ou1 J.F. 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*. 1:125-144.

ANEXO I

MEDIOS Y METODO DE DESINFESTACIÓN DE SEMILLAS DE TRIGO

Medio Papa-dextrosa-agar (PDA) y Rosa de Benagala (RB)

39 g PDA

3.3 mL Rosa de Bengala

Medio Agar-agua

Gramos por litro (g L^{-1}):

12-15 g Agar-agar

Medio mínimo sólido

Gramos por litro (g L^{-1}):

0.5	Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.5	Fosfato de potasio (dihidrogenado)	KH_2PO_4
0.2	Cloruro de potasio	KCl
0.2	Sulfato de magnesio (heptahidratado)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.1	Cloruro de calcio	CaCl_2
20	Agar-agar	

Desinfestación de semillas de trigo:

Todo el procedimiento se realiza en condiciones de asepsia

- Colocar las semillas en un frasco esterilizado, agregar agua destilada esterilizada hasta cubrir las semillas
- Agregar dos gotas de detergente líquido y agitar por tres minutos
- Decantar el agua jabonosa y enjuagar con agua destilada esterilizada hasta eliminar el detergente
- Agregar una solución 4% de hipoclorito de sodio (NaClO) hasta cubrir las semillas y agitar por 10 minutos
- Decantar el agua clorada y realizar lavados con agua destilada esterilizada hasta retirar el cloro
- Agregar suficiente agua destilada esterilizada y dejar en imbibición por 14 horas
- Retirar el agua y dejar secar sobre papel filtro esterilizado
- Sembrar cinco semillas por frasco con papel filtro y 3 mL de agua destilada esterilizada
- Regar con 3 mL de agua cuando se requiera (no exceder la cantidad de agua para evitar pudrición de la semilla)

ANEXO II

SECUENCIAS CEPAS Y DESCRIPCIÓN MORFOLOGICA.

Secuencias obtenidas para las cepas de hongos filamentosos aislados de paja de trigo, suelo y trozos de paja.

K1P (*Fusarium proliferatum*)

TAGGAGCCGATTACCCACTTCCATACCCCTGGTGAACATACCATTTGTTGCCTCGGCGGATCA
GCCCCTCCCGGTAAACGGGACGGCCCGCCAGTGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAA
CTTCTGTGTAACCCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
AAAAGAAACGCAGCCATATTTTTTTTTTCTCTCCAGACCGCTTTTTCTTTGTTCTTCCTTCTT
TAATTTTTCTTAAACCTTCCTTTTTCTTTTTTTTTTTACCTTTTTTTTTCTTTTTGCCTT
TTCTCAATTTCTTTTTATTTTTTTCTTTTTTTATTTGTTTTTATTTTTATTTTTGGTGGTTTTT
TTTTTGTGAGTCTCCCCCTACTTACACATTTTTTTCCCCTCCACTCCTATCTCCATATCTAT
CAAGAACCTATATTCTCCTATGCTTCCTTTTGTGTTTTTAATTATTTCTCTTATCTAGAACAT
CCTCTCCTACGTTGTACCTATTTGCAATATTAATCCATTAGCTCGGGCCTCCCCCTCTTCATTT
TCTTTTTGGTCTTTAACAATGATTCTTCACAATTCTCTAATTATAAATTTTTTCATCTACAAAG
ACCTATATCGCATCTCTCATCATTTTTTACAATCTATCTTCTTTTTATTTTTCTT

K2P (*Fusarium succisae*)

GGATCGCGGATTCTACTGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCG
CGACGATTACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAAT
CGATTTGGGGAACGCGATTTAACTCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAA
TGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCG
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCC
AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATA
TAGAAACAGAGTTTAGGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCC
GCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCT
CCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACATTTTTTTTTTTTTCAAAA

K8P (*Fusarium moniliforme*)

CNNNNTTTTCAAACCTGCATCCGAGGTGAACTTGTCANAAGTTGGGGTTTAAACGGCGTGGCCG
CGACGATGACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAAT
CGATTTGGGGAACGCGATTTAACTCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAA
TGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCCG
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCC
AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATA
TAGAAACAGAGTTTAGGGGTCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCC
GCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCT
CCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCATGCTCCGCCTATTGAAATG
GCCTGTGTNCACTTTTAAANATTCAGAACCCCCCTTCGAGAATAGCCCATACCGAGTTTTTAA
CTATAGAGTTAGATCTCCAGACTCATGNTTTTGACCA

K9P (*Fusarium proliferatum*)

GNCAGGGNNNTCATCTGCAGCGAGGTACATGTCAGAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCG
CGCCGCGTACCAGTTGCGAGGGTTTTACTACTACGCAATGGAAGCTGCAGCGAGACCGCCAC
TAGATTTTCGGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTT
GAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCG
TTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGGCTGCGTTC
TTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTC
AGAAGTTACATATAGAAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGA
GCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCG
GTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGTTTTTTACTTTCACAGCCTC
CGCTTATTGATATGCCTTGTGACGACTTTTACCTTCCAAACCTCCGCTTATTGATATGCCTGTG
ACGAGTTTTAATTCTAAACCTCCACTCACTGAGATGTGCTGTTGCCACGTTTTAACATCTAAC
ATCCACCTTTCGGTTTTATGCTGTTTNNNGTCTTAACACTAAAATTCACCGCNC

K12P (*Fusarium moniliforme*)

GGGGCACAGGAATNACACTCCAAACCCCTGTGAAATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAGC
CCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAAC
TTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCAAN

K13P (*Fusarium succisae*)

TNANCNCTGCAAGCGAGGTGAACATGTCATAAGTTGGGGTTTAAACGGCATGGCCGCGACGAT
GACCAGTAACGAGGGTTTTACTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGACCGCCAATCGATTTG
GGGAACGCGATTTAACTCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGGGCTTGAGGGTTGAAATGACGCT
CGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTC
ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGGCTGCGTTCATCGATGCCAGAACC
AAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAGTTACATATAGAAA
CAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGGCTGATCCGCCGAG
GCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTG
GTTACCAACGGAGACCTTGTACGACTTTTTACTTCCATGCCCGGCTTATGGAAAGGCCTG
GTGCCAACTTTAACTTCCAAGACCCCGCTTTGGATATGCGTGTGTGCGAAGTTTTACTTATC
ACTCCCGCTCTGGTTTGTGGTGTGCCAGTGTTACACTCTCTAAACACACCTCTTGTGTGGT
ATGAGATGNACAGCGTAAAACCCCTCCCTA

K14P (*Fusarium moniliforme*)

GGGTGACCGCAGTTACACTTCCAAACCCCTGTGAAATACCAATTGTTGCCTCGGCGGATCAG
CCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAA
CTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATAAAGAACGCAGCAANAN

K1S (*Fusarium oxysporum*)

CAAANNNGNNGCNGAGGGAAGGGATCAGTCCCGAGTTGACAACTCCCAAACCCCTGTGAAA
CATACCACTTGTTCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAG
GACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAAACTTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTG
AATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCTTGGTGTGGGACTCGCGTTA
ATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCT
CGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATC
AGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAATCCTCCGCTTATTGA
TATGCCTTGTGACGACTTTTACTTCCATCTTCCACGTATTGATATGCGATGTGACGACATTCA
CATCTAAATACCAGACTCTGCTATGAGTTGTGCGACATTTATATCTATACCCCCGTTTTTTG
AGCGTTATGTCACGAATTATTGTCTGATCACACGTCTATAGATGGGCGGAGGGCCTTCACT
CTGGTGGGGCATCCACAGAGGGAATGGGCCCTTCCATAATCCCCGCACAGCACACCCCTCTC
CCCCGGAAGAAAATTCTTCTTATTCTTAAATCTGTGCATACATGCGCACTTACGATGCA
ATACTCATCCTATCATTGNNACCTCGATCTGCAAACCTCCAAAAAGCCNGTCATGTAGCCTTA
TCACACTCAT

K8S (*Penicillium janthinellum*)

GGGAACTGGGTTCCCTACCTGATCCGAGGTACCTGAGAAAGATTGAGGGGGGTGCGCCGGCG
GGCGCCGGCCGGGCCTACGGAGCGGGTGACGAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGG
TGCCGCGCTGCCTTTCGGGGCCCCCGGAGCCGGGGGGCGGGGCCAACACACAAGCC
GTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAA
TGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGATTTCGC
TGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTAGCTA
ATCGCTCAGACTGCAATCTTCAGACAGCGTTCAGGGGGGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGG
GGCGGGTGGCCCCCGGCGGCCATGACGGCGGGCCCCGCGAAGCAACTAGGTATGATAAACA
CGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAGGGCCCTACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTA
CGGAAACCTTGTTACGATTTTTTACCTTCCAAAACTTAAAC

K11S (*Fusarium equiseti*)

AGGGGGATGACTGGCATTCTACCTGATCCGAGGTACATTTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCG
TGGCCGCGACGATTACCAGTAACGAGGTGTATGATTACTACGCTATGGAAGCTCGACGTGAC
CGCCAATCGATTTGGGGAACGCGGGTTACCGCGAGTCCCAACACCAAGCTGAGCTTGAGGGT
TGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAA
GATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGCTGCGTTCTTCATC
GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTTGTTTTACTCAGAAG
TTCCACTAAAAACAGAGTTTTAGGGGTCTTCGGGCGGGCCGTCCTTTTTACGGGGCGCGGGC
TGATCCGCCGAGGCAACGTATAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAAT
GATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACGATTTTTTACTTCCAAAACCTGCTGTG
AAAG

K14S (*Mucor circinelloides*)

GGGGTATCATCATAAATTTTGGCTTGTCAATTATTATCTATTTACTGTGAACTGTATTATTACTT
GACGCTTGAGGGATGCTCCACTGCTATAAGGATAGGCGGTGGGGATGTTAACCGAGTCATAG
TCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACCAAAAAGAATTCAGAATTAATATTGTAACA
TAGACCTAAAAAATCTATAAAACAACTTTTAACAAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGA
AGAACGCAGCAAAAACCCCCCTCCCCCGCTTCTGGCCCCGCGTCTTAAACCCATCTCTGC
CCCACCCAACCAACAAGAACCCTAACTCCCTCCTTTCCTGGTTTCCTCTTTTGTCTTTTGGCG
GTCTGCCCTTTTGGCGGCCTCCCCCGACTTACACTTTATTTTCCCCTCCCGCTGCATCACCGA
GGCATCGAGAAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGGAACTCGGTAATGATCCCTCCGC
TGGATCATCAACGGATACCTTGTACAAATACAGCAAATTAACCAATATTTTGGGTCTGGC
ACCTTAATTTTTTTTTAGTTTTTTTTTTCATTGTTCTTTCGCGTTTTTTTTAGTTATTTATT

K3TP (*Fusarium moniliforme*)

GGNNNNNNNCACCTGCATCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGGTTTAAACGGCTTGGCCGCGCC
GCGTACCAGTTGCGAGGGTTTTACTACTACGCAATGGAAGCTGCAGCGAGACCGCCACTAGA
TTTCGGGGCCGGCTTGCCGCAAGGGCTCGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGG
GTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAA
AGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTGTCTGCGTTCTTCAT
CGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTATGGTTTTACTCAGAAG
TTACATATAGAAACAGAGTTTAGGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCCGTTTTACCGGGAGCGGG
CTGATCCGCCGAGGCAACAATTGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTAACTCGGTAAT
GATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTACTTTTTTTTTTATTTACACANCCCCCGC
TTTTTGGTATGCCGTTGGTTTTCCGAACTTTTAACTTCTCACACACCCCCGCTTTTTTGGAAATTGG
CGTGTGCCAAATTTTTAATTCTCAAACCCCCCTTTTTGGNATTGGCTTGGTCCAATTTTAA
ATTAATAAACCCCCCTTTTGGAGAGGGGCGGGGGGAAATTTTTTANTNCAAACACCCCC
TTCTNNGGNAGGGCTGGTTCCCAATTTCTG

K11TP (*Alternaria alternata*)

NNNNNNNNNCANCCNCCGCTTATTGATATGCCGTGTGACGACTTTTAGTTCCATCCCCCGCTCA
TTGAGATGAGTTGTGCTTACATTTACTTTTCATACCCCCCGCCGGATGCGATTAGTTTAAAGG
TTAGTCTCCACCACAGCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGCCAAAT
GACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGA
TGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCA
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATT
ACAAAAGGTTTATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCA
AAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATA
TTTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACACTTTTAACTTCCAG
CATCCGCTGCTTGATGTGCCGCGTTGCGACTATTTTTTCCAACCATCCGCCGCTTAATGTGAG
TTGTGGCGACTATTTTTTTCCTATCAACCCCCCTTGATGTGAGGTGTTGCGATTTTTATTTA
TAAAACCCGCGCCCTGATGGAGATGTGGNTGCCAATAATAACAAAACATCCCCCCCCCT
TGATANATTGTTTGAAGGATATATCATCCCACCCCCAGCACCTTCGAAGATATTGT

Características macro y microscópicas de hongos filamentosos de paja de trigo molida.

Características macro y microscópicas de hongos filamentosos de paja de trigo molida.												
Macroscópicas										Microscópicas		
Características Superficiales					Características de Micelio Profundo					Hifas	Cuerpo Fructífero	Esporas
Cepa	Aspecto	Consistencia	Desarrollo	Color	Pigmento	Desarrollo	Color	Modif. al Medio				
Paja de trigo molida	K 1 P	AL	H	CON	Blanco con anillos rosados	CC	PZ	Blanco con anillos rosados	No	S	CNF	MICR
	K 2 P	LAN	H	CON	Anillos blanco-purpura alternados	CC	PZ	Blanco con anillos purpura	No	S	CNF	MICR y MAC
	K 8 P	AC	H	CON	Blanco con anillos violeta	CC	PZ	Blanco con anillos rosados	No	S	CNF	MICR y MAC
	K 9 P	AL	H	CON	Blanco al centro rosa en bordes	CC	PZ	Anillos violeta Bordes blancos	No	S	CNF	MICR y MAC
	K 12 P	LAN	H	CON	Centro rosa fuerte bordes rosados	CC	PZ	Centro rosa fuerte bordes rosados	No	S	CNF	MICR y MAC
	K 13 P	LAN	H	CON	Blanco con anillos violeta	CC	PZ	Blanco	No	S	CNF	MICR y MAC
	K 14 P	AC	H	CON	Centro rosa bordes blancos	CC	PZ	Blanco con anillos rosas	No	S	CNF	MICR y MAC
AC= Algodonoso compacto		S= Seca		ES= Escaso		CC= Circunscrito a la colonia		PZ= Por zonas concéntricas		S= Septadas		
AL= Algodonoso Laxo		H= Húmeda		REG= Regular		DF= Difuso en el medio		HOM= Homogéneo		NS= No septadas		
CER= Cerebriforme		CR= Cremosa		AB-DI= Abundante Difuso				SET= Sectorial		CNF= Conidióforos		
LIS= Liso				AB-RA= Abundante Radial						CO= Conídios		
LAN= Lanoso				AB= Abundante						MICR= Microconidios		
AT-LAN= Aterciopelado Lanoso				DI= Difuso						MAC= Macroconidios		
ALG= Algodonoso				CON= Concéntrico						CLAM= Clamidosporas		
										ESP= Esporas		

Características macro y microscópicas de hongos filamentosos aislados de suelo agrícola y trozos de paja de trigo.

		Macroscópicas								Microscópicas			
		Características Superficiales				Características de Micelio Profundo							
		Cepa	Aspecto	Consistencia	Desarrollo	Color	Pigmento	Desarrollo	Color	Modif. al Medio	Hifas	Cuerpo Fructífero	Esporas
Suelo	K1S	AL	H	CON	Blanco	CC	HOM	Bco. anillos rosados	No		S	CNF	MICR y MAC
	K 8 S	AT-LAN	H	CON	Blanco	CC	HOM	Blanco cremoso	No		S		CO
	K 11 S	AC	H	REG	Blanco-Beige	CC	HOM	Beige- café	No		S	CNF	MAC
	K 14S	AL	H	CON y AB	Beige- gris	CC	PZ	Café- gris	No		NS		CO
Trozos Paja	K3TP	ALG	H	CON	Blanco	CC	PZ	Bco. anillos rosados	No		S	CNF	MICR
	K11TP	AT	H	CON	Verde- gris	CC	PZ	Verde- negro	No		Septadas		ESP
		AC= Algodonoso compacto		S= Seca	ES= Escaso		CC= Circunscrito a la colonia	PZ= Por zonas concéntricas		CNF= Conidióforos			
		AL= Algodonoso Laxo		H= Húmeda	REG= Regular		DF= Difuso en el medio	HOM= Homogéneo		CO= Conídios			
		CER= Cerebriforme		CR= Cremosa	AB-DI= Abundante Difuso		SET= Sectorial		MICR= Microconidios				
		LAN= Lanoso		AB-RA= Abundante Radial		DI= Difuso		S= Septadas		MAC= Macroconidios			
		AT-LAN= Aterciopelado Lanoso		CON= Concéntrico		NS= No septadas				CLAM= Clamidosporas			
		ALG= Algodonoso								ESP= Esporas			

