

**RESISTENCIA DE CEPAS DE *MICROSPORUM FULVUM*
A HERBICIDAS PREEMERGENTES (*)**

D. P. Alvarez, A. G. Luque y M. E. Gamberale (**)

Departamento de Microbiología (Area Micología). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario.
Suipacha 531. 2000 Rosario, Santa Fe.

RESUMEN

Se realizó el estudio de la capacidad germinativa y de crecimiento de cepas fúngicas queratinolíticas correspondientes a *Microsporium fulvum* aisladas de suelos agrícolas con y sin aplicación de los herbicidas Atrazina, Metribuzín y Alachlor. Para ello fue empleado el medio de Agar Sabouraud Glucosa con concentraciones crecientes de esos agroquímicos. No se comprobó diferencias estadísticamente significativas, en esas etapas del desarrollo, entre las colonias provenientes de parcelas tratadas con Metribuzín y Alachlor y las testigos, pero las resistentes a Atrazina mostraron mayor capacidad de germinación y crecimiento con respecto a los controles, a medida que se incrementó la dosis de ese biocida. El aislamiento de esas cepas puede constituirse en indicador de un alto grado de polución por Atrazina, en los suelos.

Palabras Clave: herbicidas, Atrazina, Metribuzín, Alachlor, hongos queratinolíticos, *Microsporium fulvum*.

RESISTANCE OF *MICROSPORUM FULVUM* STRAINS TO PRE-EMERGENCE HERBICIDES

ABSTRACT

The germinative and growth capacity of keratinolytic strains of *Microsporium fulvum* isolated from prairie soils with and without the herbicides Atrazine, Metribuzin and Alachlor was studied. Agar Sabouraud Glucose with increasing concentrations of these herbicides was used. During the development cycles, there was no statistically significant difference between the colonies from plots treated with Metribuzin and Alachlor and the controls; however, the strains resistant to Atrazine showed a greater capacity to germinate and grow with respect to the controls as the dose of biocide was increased. The isolation of these strains may indicate a high degree of pollution produced by Atrazine in soils.

Key words: herbicides, Atrazine, Metribuzin, Alachlor, keratinolytic fungi, *Microsporium fulvum*.

(*) Trabajo subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

(**) Departamento de Matemáticas y Estadística de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

INTRODUCCION

El uso continuado de diversos herbicidas en la producción agrícola, motiva el interés por conocer la influencia de tales agroquímicos sobre las poblaciones microbianas que interactúan en los suelos cultivables y que directa o indirectamente reciben tales productos (Anderson et al., 1981; Atlas et al., 1978; Johnen, 1978; Tu y Mites, 1976). Esa biomasa, que está íntimamente relacionada con la estructura de los suelos y por lo tanto con la vida terrestre, abarca muy diversas comunidades fúngicas, entre ellas las reconocidas como queratinolíticas y a la vez patógenas para el hombre. Sobre tales poblaciones, hemos observado en experiencias anteriores (Alvarez et al., 1986) un efecto depresivo en la viabilidad de algunos de esos grupos al practicarse tratamientos desmalezantes a las dosis habituales con Atrazina, Metribuzín y Alachlor, en suelos cultivados.

Se comprobó, además, en un posterior estudio (Alvarez et al., 1988), que al aumentar la concentración de tales herbicidas, en condiciones de laboratorio, se inhibe el crecimiento y la germinación de cepas de *Microsporium fulvum*, *Microsporium gypseum*, *Keratinomyces ajelloi*, aisladas de las parcelas experimentales. Asimismo, las colonias de *M. fulvum*, con el mayor desarrollo en los muestreos pertenecientes a los sectores tratados con los fitotóxicos referidos, mostraron un comportamiento distinto del de las colonias testigos en cuanto a la capacidad de utilizar diferentes compuestos carbonados y nitrogenados, comportamiento que los ubica como resistentes y a la vez seleccionadas por la acción herbicida.

Con esas cepas de *M. fulvum* se estudió la evolución del crecimiento y la capacidad germinativa de sus conidios, en presencia de concentraciones crecientes de Atrazina, Metribuzín y Alachlor, a fin de comprobar si el aumento en las dosis puede determinar, no sólo cambios bioquímicos, sino también a nivel de las etapas del desarrollo que permiten la continuidad de esa población en los suelos.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de *M. fulvum* en estudio fueron obtenidas de parcelas de suelos cultivables, a los 30 días de ser tratados con los herbicidas preemergentes: Atrazina (2-cloro-4-(etil-amino) 6 (isopropil-amino) 5 -triazina), Metribuzín (4-amino-6-(1,1-dimetil)-3-(metiltio)-1,2,4-triazina-5 (4H)-one) y Alachlor (2-cloro-(2,6 dietil)-N-(metometil)-acetamida) a la concentración de 2,5 ppm, conside-

rando las colonias aisladas de un cuarto sector sin ningún tratamiento como testigos. Se trabajó así, en el desarrollo experimental, con cepas de *M. fulvum* de suelos sin herbicida (Cepa 1) y con aplicación de Atrazina (Cepa 2), Metribuzín (Cepa 3) y Alachlor (Cepa 4).

A partir de esas colonias de 15 días de siembra en medio de Agar Sabouraud Glucosa, se realizaron suspensiones de sus macroconidios, en igual sustrato líquido y por agitación en el Vortex, hasta alcanzar una concentración aproximada de los mismos de 10^4 por ml.

A tales suspensiones fueron adicionados los tres herbicidas del ensayo para tener las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm, efectuándose cada cultivo por triplicado. Con esas siembras incubadas en baño agitado a 28°C, se realizó el recuento de macroconidios germinados sobre un total de 100, considerando la formación de un tubo germinativo cuando se superaba longitudinalmente el diámetro transversal mayor de los conidios.

Para conocer el efecto de los herbicidas referidos sobre el crecimiento de las cepas *M. fulvum* en sus cuatro variables, se practicó con colonias de 15 días de desarrollo el repique de porciones de micelio de alrededor de 2 mm de diámetro en cajas de Petri con medio de Agar Sabouraud Glucosa más el agregado de Atrazina, Metribuzín y Alachlor hasta tener concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm de cada biocida. Las siembras así efectuadas se incubaron a 28°C durante dos semanas, determinándose a intervalos de tres días el diámetro promedio por duplicado. Aunque generalmente se acepta que el peso seco del micelio refleja más exactamente su grado de desarrollo, la extensión radial es de gran significación ecológica puesto que la colonización va a depender de ese parámetro.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante la técnica de comparación de dos promedios independientes para cada concentración ("t" de Student), con un nivel de significación del 5%. Al analizar la capacidad germinativa de cada cepa, se trabajó con variable transformadora por tratarse de porcentajes.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se consignan los porcentajes promedios de conidios germinados al cabo de 12 horas de incubación, correspondientes a las cepas de *M. fulvum*, aisladas de suelos no tratados y con aplicación de los herbicidas.

Tabla 1. Comparación estadística de los porcentajes de conidios germinados al cabo de 12 horas de siembra, correspondientes a cepas de *Microsporium fulvum* aisladas de suelos sin tratamiento con herbicida (Cepa 1) y con aplicación de Atrazina (Cepa 2), Metribuzín (Cepa 3) y Alachlor (Cepa 4).

Concen- tración de Atrazina (ppm)	Promedio del % de conidios germi- nados		Valor de t	Concen- tración de Metribuzín (ppm)	Promedio del % de conidios germi- nados		Valor de t	Concen- tración de Alachlor (ppm)	Promedio del % de conidios germi- nados		Valor de t
	Cepa 2	Cepa 1			Cepa 3	Cepa 1			Cepa 4	Cepa 1	
0	34.0	30.5	0.026*	0	32.0	30.5	0.71*	0	37.5	30.5	-2.51**
5	24.5	12.5	4.32*	5	13.0	11.5	1.35*	5	5.0	8.5	-2.85**
10	15.0	11.0	2.80*	10	10.5	10.0	0.22*	10	4.5	6.5	-1.30**
25	13.5	9.0	3.73*	25	7.5	5.5	1.23*	25	2.5	0	-
50	11.5	9.5	1.28*	50	0	0	-	50	0	0	-

*: Valor significativo para $t > 2.92$ ($\alpha: 0.05$)

**: Valor significativo para $t < -2.92$ ($\alpha: 0.05$)

Considerando los datos obtenidos para Atrazina, se comprueba que los porcentajes medios de conidios germinados son estadísticamente similares cuando no hay agregado de ese producto al medio de cultivo, pero la capacidad germinativa es significativamente mayor cuando su concentración alcanza a 5 y 25 ppm (para $\alpha = 0,05$, $t = 2,92$).

Considerando los datos obtenidos como resultado del tratamiento con Metribuzín y Alachlor, no se observan diferencias significativas entre los

porcentajes de conidios germinados entre las Cepas 3, 4 y la Cepa 1, salvo con una concentración de 25 ppm de Alachlor, a la que la Cepa 1 presenta inhibición total y la Cepa 4 produce un 2,5 % de conidios germinados.

En la Tabla 2 se incluyen los diámetros promedios correspondientes al desarrollo en Agar Sabouraud Glucosa con cantidades crecientes de los herbicidas de prueba y sin la incorporación de los mismos.

Tabla 2. Comparación estadística del diámetro promedio de las colonias de *Microsporium fulvum* aisladas de suelos sin tratamiento con herbicida (Cepa 1) y con aplicación de Atrazina (Cepa 2), Metribuzín (Cepa 3) y Alachlor (Cepa 4) al cabo de 15 días de siembra.

Concen- tración de Atrazina (ppm)	Diámetro promedio de las colonias (mm)		Valor de t	Concen- tración de Metribuzín (ppm)	Diámetro promedio de las colonias (mm)		Valor de t	Concen- tración de Alachlor (ppm)	Diámetro promedio de las colonias (mm)		Valor de t
	Cepa 2	Cepa 1			Cepa 3	Cepa 4			Cepa 4	Cepa 1	
0	72.0	71.0	0.71*	0	69.0	71.0	-1.38**	0	69.0	71.0	-1.38**
5	63.5	34.5	18.30*	5	62.5	65.5	-1.89**	5	34.0	31.5	1.21**
10	62.0	33.5	15.80*	10	36.0	36.0	0	10	27.5	31.5	-2.17**
25	62.0	43.0	5.82*	25	0	0	-	25	0	0	-
50	49.0	45.0	4.0*	50	0	0	-	50	0	0	-

*: Valor significativo para $t > 2.92$ ($\alpha: 0.05$)

**: Valor significativo para $t < -2.92$ ($\alpha: 0.05$)

En el medio con Atrazina, a las concentraciones de 5, 10, 25 y 50 ppm, las colonias alcanzan con respecto a los controles un diámetro significativamente mayor ($\alpha = 0,05$, $t = 2,92$), aumento que va disminuyendo paulatinamente a medida que se incrementa la dosis del herbicida; sin agregado del mismo no se demuestra variación

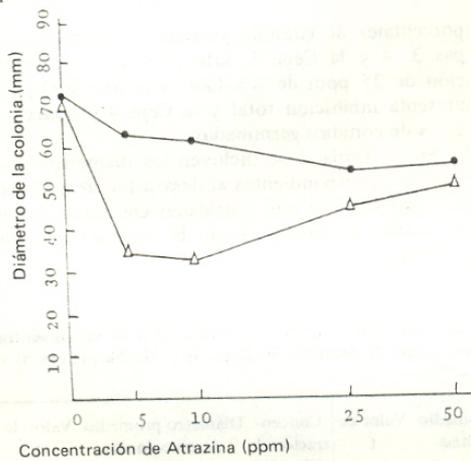
en los diámetros promedios comparados.

Con la incorporación de Metribuzín a las concentraciones de 5 y 10 ppm, no hay diferencias entre las dos cepas estudiadas, y con 25 y 50 ppm en ambas se produce la inhibición del desarrollo; igual comportamiento se tiene con Alachlor.

DISCUSION

De acuerdo con estos resultados, las cepas de *M. fulvum* que han demostrado ser resistentes, en los suelos, a la aplicación de Metribuzín y Alachlor, en la dosis de 2, 5 ppm, al incrementarse in vitro las concentraciones de tales compuestos, no manifiestan variaciones significativas con respecto a las colonias testigos, en cuanto al efecto represivo e inhibitorio sobre el proceso de la germinación y en las etapas del desarrollo.

Cuando ese incremento está dado por Atrazina, las cepas tolerantes estarían en mejores condiciones de crecimiento y expansión micelial que aquéllas que no experimentaron una adaptación previa a un medio con ese agroquímico. Esa



△: Cepa 1, aislada de suelos sin herbicida.
●: Cepa 2, aislada de suelos con aplicación de Atrazina.

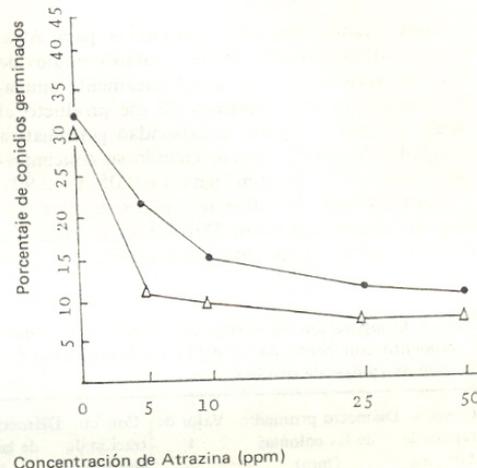
Datos obtenidos por duplicado a los 15 días de siembra.

Fig. 1. Influencia de Atrazina sobre el desarrollo de cepas de *Microsporium fulvum*, aisladas de suelos con y sin aplicación del herbicida.

Trabajos de Williams y Pugh (1975) y Smith y Lyon (1976) destacan la capacidad de especies pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Chrisosporium* para inactivar productos mercuriales por absorción, seguida de una reacción complejante por grupos tioles no proteicos, lo que permite mantener los sistemas enzimáticos protegidos. Este comportamiento ha determinado que se reconociera a estas cepas como marcadoras del grado de polución que presentan los suelos por derivados mercuriales.

adaptación puede significar mayor capacidad desintoxicante por mecanismos ya inducidos y en consecuencia más posibilidades de contrarrestar efectos tóxicos; esto no ocurre con compuestos que responden a la estructura de Metribuzín y Alachlor, los que tendrían efecto letal al acumularse en los suelos.

Por lo tanto, de las colonias de *M. fulvum* estudiadas que muestran diferencias metabólicas comparadas con la cepa testigo, sólo la resistente a una primera dosis de Atrazina presenta, en lo que hace a los ciclos de germinación y desarrollo estudiados, variaciones estadísticamente significativas, que se traducen en una mayor tolerancia a concentraciones crecientes de tal herbicida, tal como se muestra en las Fig. 1 y 2.



△: Cepa 1, aislada de suelos sin herbicida.
●: Cepa 2, aislada de suelos con aplicación de Atrazina.

Datos obtenidos por duplicado a las 12 horas de incubación.

Fig. 2. Influencia de Atrazina sobre la germinación de cepas de *Microsporium fulvum* aisladas de suelos con y sin aplicación del herbicida.

Si bien las condiciones experimentales de laboratorio no pueden extrapolarse a la complejidad de los suelos, conociendo según varios trabajos (Jones et al., 1982; Muri y Baker, 1978; Dao y Lavy, 1978) la persistencia de derivados de triazinas y sus productos de degradación, debido fundamentalmente a su alta movilidad y adsorción a compuestos orgánicos de los suelos, es de interés estudiar de qué manera las cepas de *M. fulvum* reconocidas como resistentes a altas concentraciones de Atrazina participan en el proceso de

transformación de este fitotóxico, con tan marcada influencia en los suelos.

Por otra parte, estas colonias resistentes mostraron variaciones en su pigmentogénesis y grado

de fertilidad, siendo indicadoras de un comportamiento bioquímico que incidirá en el equilibrio de las poblaciones queratinolíticas geofílicas.

REFERENCIAS

- Alvarez, D. P.; A. Luque, P. Marini y M. E. Gamberale, 1986. Influencia de herbicidas sobre la micota queratinolítica de los suelos. Boletín Micológico, 3: 81-85.
- Alvarez, D. P.; A. Luque; P. Marini y M. E. Gamberale, 1988. Influencia de herbicidas preemergentes en suelos agrícolas, sobre el desarrollo de dermatofitos geofílicos. Enviado para su publicación al Boletín Micológico.
- Anderson, J. P. E.; R. A. Armstrong y S. N. Smith, 1981. Methods to evaluate pesticide damage to the biomass of the soil microflora. Soil Biol. Biochem. 13: 149-153.
- Atlas, R. M.; D. Pramer y R. Bartha, 1978. Assessment of pesticide effects on nontarget soil microorganisms. Soil Biol. Biochem. 10: 231-239.
- Dao, T. H. y T. L. Lavy, 1978. Atrazine adsorption on soil influenced by temperature, moisture content, and electrolyte concentration. Weed Sci. 26: 303-308.
- Johnen, B. G., 1978. Recent advances in the study of effects of pesticides on the population dynamics of nontarget microorganisms. Proc. Brit. Crop Protect. Conf. Weeds, 1037-1046.
- Jones, T. W.; W. M. Kemp; J. C. Stevenson y J. C. Means, 1982. Degradation of Atrazine in estuarine water, sediment systems and soil. J. Environ. Qual. 2: 633-637.
- Muri, D. C. G. y B. E. Baker, 1978. The disappearance and movement of three triazine herbicides and several of their degradation products in soil under field conditions. Weed Res. 18: 111-120.
- Smith, S. N. y J. E. Lyon, 1976. The break-down of paraquat and diquat by soil fungi. New Phytologist, 77: 735-740.
- Tu, C. M. y J. R. N. Mites, 1976. Interaction between insecticides and soil microbes. Residue Rev. 60: 102-140.
- Williams, J. I. y F. J. G. Pugh, 1975. Resistance of *Chrysosporium pannorum* to an organomercury fungicide. Trans. Br. Mycol. Soc. 64: 255-263.