

INFLUENCIA DE HERBICIDAS PREEMERGENTES SOBRE EL DESARROLLO DE DERMATOFITOS GEOFILICOS EN SUELOS AGRICOLAS (*)

Delia P. Alvarez, Alicia G. Luque y Patricia Marini
Departamento de Microbiología. (Area Micología).
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario.
Suipacha 531. Rosario (2000). Santa Fe. República Argentina.

María E. Gamberale
Departamento de Matemáticas y Estadísticas
de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
de la Universidad de Rosario.

Palabras claves: Herbicidas, dermatofitos geofilicos.

Key words: Herbicides, geophilic dermatophytes.

RESUMEN

*El objetivo de este trabajo es conocer la acción ejercida por concentraciones crecientes de herbicidas de presiembra (Metribuzin, Atrazina y Alachlor) sobre el crecimiento y la capacidad germinativa de *Microsporum fulvum*, *Microsporum gypseum* y *Keratinomyces ajelloi**

Comprobamos un efecto depresivo e inhibitorio de los biocidas sobre la germinación y el crecimiento de las cepas en estudio. Alachlor es el que presenta mayor poder inhibitorio y en menor grado Metribuzin y Atrazina.

Además, comprobamos que esta acción ocurre sólo cuando los hongos se ponen en contacto con los herbicidas en medio de Sabouraud glucosa, que aparentemente los haría más disponibles a los propágulos fúngicos.

Estos resultados nos indican la importancia que tienen, las interrelaciones entre distintas sustancias, en los efectos producidos sobre la micota de los suelos, resaltando la necesidad de que en estas experiencias nos aproximemos cada vez más a las condiciones presentes en los habitat naturales.

SUMMARY

[Effects of preemerging herbicides applied to farm soils on the development of geophilic dermatophytes]

*The aim of this work is to know the effect of preemerging herbicides in going-on concentrations (Metribuzin, Atrazine and Alachlor) on the growth and the germinative capacity of *Microsporum fulvum*, *Microsporum gypseum* and *Keratinomyces ajelloi*. An inhibitory and depressive effect of the agrochemistrics on germination and the growth of the studied strains were proved. Alachlor is the greatest inhibitor of all the herbicides. This inhibitory action only occurs when the fungi are in contact with Sabouraud glucose culture which makes herbicides available to fungi propagules. These results indicate the importance of the different substances interrelations have on the effects on the mycota of the soils.*

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (1) informamos acerca de las variaciones que se producen sobre la micota queratinolíticas de los suelos, por la aplicación en

dosis habituales, de tres herbicidas preemergentes: Metribuzin, Atrazina y Alachlor. A los seis meses se repitió la misma experiencia, tratando de reproducir las condiciones que se presentan en las actividades rurales. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de las especies de dermatofitos aislados a partir de ambas aplicaciones. Además encontramos, en esas condiciones experimentales, que los herbicidas ocasionaron alteraciones en el metabolismo de cepas de

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

Microsporium fulvum. Para conocer con mayor profundidad, las modificaciones que estos biocidas producen sobre las cepas queratinolíticas, consideramos de interés estudiar dos procesos tan importantes en el ciclo biológico de los hongos como son: la germinación y el crecimiento. En numerosos trabajos se informa acerca del efecto de diversos agroquímicos sobre dichos procesos (2, 3, 4, 6, 7, 8), obteniéndose resultados variados, que dependen, en gran medida del grupo de hongos considerado. Por ello estudiamos los efectos en la germinación y el desarrollo de tres cepas queratinolíticas aisladas de suelos: *Microsporium fulvum*, *M. gypseum* y *Keratinomyces ajelloi*, empleando concentraciones de los herbicidas comparables a las dosis habituales y aún superiores, teniendo en cuenta que en la naturaleza puede producirse una acumulación de los mismos, ya sea por reiteradas aplicaciones o bien por defectos en su biodegradación (5).

MATERIALES Y METODOS

1. Influencia de los herbicidas sobre la germinación de cepas de *Microsporium fulvum*, *M. gypseum* y *Keratinomyces ajelloi*:

A partir de los cultivos de estos hongos en agar Sabouraud Glucosa se realizaron suspensiones, conteniendo aproximadamente 10^4 Macroconidios/ml. en Sabouraud Glucosa líquido con concentraciones de 0, 5, 10, 25 ppm de Matribuzin, Atrazina y Alachlor.

Estas suspensiones se incubaron a 28° C en baño agitado, tomándose alícuotas de las mismas a las 6, 9 y 12 horas.

Por observación microscópica se realizaron contajes de macroconidios germinados sobre un total de 100 elementos. Cada uno se contabilizó como una unidad, considerándose germinados cuando el tubo germinativo presentó la mitad del diámetro transversal de la unidad.

2. Influencia de los herbicidas sobre el crecimiento de cepas de *Microsporium fulvum*, *M. gypseum* y *Keratinomyces ajelloi*:

a) Se sembraron las cepas en estudio, en placas de Petri conteniendo Agar Sabouraud Glucosa adicionado de los herbicidas en concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50 ppm. por duplicado. El desarrollo de las mismas se midió a través del diámetro transversal promedio de las colonias obtenidas, observadas cada 3 días durante 15 días.

b) Se realizaron suspensiones de propágulos de las cepas en agua y Sabouraud Glucosa líquido llevados a concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50 ppm de los herbicidas, dejándose en contacto durante 24 y 48 horas. Dichos propágulos, previamente lavados, se sembraron en placas de Petri con Agar Sabouraud Glucosa, midiéndose periódicamente el tamaño de las colonias obtenidas.

3. Metodología estadística:

Para estudiar los resultados del proceso de crecimiento se realiza análisis de varianza (ANOVA) a efectos de comparar los promedios de diámetros (en mm) logrados sin tratamiento y en presencia de los 3 herbicidas a cada una de las cuatro concentraciones.

Para cada cepa y cada concentración de biocidas, a las 12 horas de incubación, se utiliza un ANOVA a un criterio de clasificación, Modelo I con cuatro niveles: sin herbicida, con Alachlor, con Metribuzin, con Atrazina.

Luego se realizan comparaciones entre pares de promedios que resultan de interés, por el método de Tukey trabajando con una probabilidad de error tipo I de 0.05.

En cuanto al proceso de germinación se emplea una metodología similar a la anterior, pero como la variable X es "porcentaje de conidios germinados", el análisis estadístico se realiza con la variable de transformación $Y = \arcsen \sqrt{X}$.

RESULTADOS

1. Efecto sobre la germinación.

En general se observa un efecto depresivo e inhibitorio de los herbicidas sobre la germinación de las cepas en estudio, el que aumenta a medida que se incrementa la concentración de los mismos, especialmente a 5 y 10 ppm. En general, el mayor efecto relativo a esas concentraciones se observó a las 12 hrs. de incubación (Figuras 1 a la 5).

Para las 3 cepas, Alachlor fue el insecticida que produjo la mayor depresión a la menor concentración (Figuras 1 a la 5).

Considerando cada una de las cepas por separado, a las 12 hrs. de incubación, se observó que *M. fulvum* presentó una disminución significativa del porcentaje de germinación respecto del testigo de los tres herbicidas probados, a partir de la menor concentración (5 ppm). Con Alachlor

siempre se obtuvo una germinación menor que con los otros dos biocidas ya que a 10 ppm se produjo inhibición total. A la concentración de 50 ppm, Metribuzin produjo inhibición total. Con Atrazina (Figuras 1 a la 3), se presentó una disminución significativa del porcentaje de germinación respecto del testigo, a partir de 5 ppm de concentración, con los tres herbicidas (la diferencia D resulta 4.49). Alachlor y Atrazina no fueron inhibidores a todas las concentraciones probadas, no obstante el porcentaje de germinación fue siempre mayor con este último herbicida. El comportamiento de Metribuzin fue similar al de Alachlor hasta las 25 ppm (para 10 ppm $F = 6.32$; $F_{2.3}$; $0.95 - 9.55$), pero al aumentar a 50 ppm Metribuzin inhibió la germinación (Figura 4).

A diferencia de los resultados obtenidos para *M. fulvum* y *M. gypseum*, la cepa de *Keratinomyces ajelloi* con los herbicidas Atrazina y Metribuzin, a la concentración de 5 ppm no se produjo una disminución significativa del porcentaje de germinación respecto del testigo; tan solo se tuvo ese efecto con Alachlor (diferencia $D = 5.34$). A 10, 25 y 50 ppm, Metribuzin y Atrazina presentan un efecto similar (por ejemplo 25 ppm $F = 5.88$; $F_{2.3}$; $0.55 - 9.55$), siendo en general menor la capacidad germinativa con Alachlor, aunque se mantuvo a través de todas las concentraciones (por ejemplo 5 ppm diferencia $D = 5.34$) (Figura 5).

En la observación microscópica de las suspensiones incubadas con 25 y 50 ppm de Alachlor, se encontraron macroconidios oscuros, de aspecto granular y con contenido citoplasmático muy vacuolado, características que indican una plasmolisis de las células conidiales.

2. Efecto sobre el crecimiento

Para *M. fulvum*, el único herbicida, de los ensayados, que a 5 ppm no produjo una disminución significativa del crecimiento radial, respecto del testigo, fue Metribuzin, ($d = 5.5$; $D = 6.90$). A 10 ppm los tres biocidas presentaron un efecto similar, pero a 25 ppm se obtuvo inhibición del crecimiento con Alachlor y Metribuzin. El comportamiento de Atrazina definió totalmente del de estos compuestos, ya que a partir de 10 ppm se produjo un aumento significativo del desarrollo, el que se mantuvo hasta 50 ppm (Figura 6).

En cuanto a la cepa de *M. gypseum*, al igual que para *M. fulvum*, el único herbicida que a 5 ppm no produjo disminución significativa del crecimiento respecto del testigo, fue Metribuzin, ($d = 2$; $D = 3.53$). Alachlor provocó una reducción más pronunciada con inhibición a 10 ppm. Atrazina en cambio posibilitó el crecimiento a través de todas las concentraciones probadas (Figura 7).

Con la cepa de *Keratinomyces ajelloi* se observó una disminución significativa del diámetro promedio a la menor concentración, con los tres herbicidas (para Metribuzin $d = 11.5$; $D = 4.55$), en especial con Alachlor que provocó una disminución más pronunciada y una inhibición más rápida, a 10 ppm. Atrazina no inhibió esta cepa, pero el promedio disminuyó paulatinamente a medida que aumentaba la concentración de 10 ppm fue muy similar al alcanzado con Atrazina, pero el crecimiento se anuló bruscamente a 25 ppm (Figura 8).

Además se observó una modificación de la macromorfología de las colonias en presencia de Alachlor y Metribuzin ya que tienen un aspecto más aterciopelado, son menos elevadas y menos pigmentadas que las colonias testigos.

En los cultivos obtenidos a partir de los propágulos suspendidos en agua con los herbicidas y lavados, no se observaron alteraciones significativas del crecimiento fúngico.

En cambio, cuando las suspensiones se realizaron en Sabouraud-Glucosa líquido, se produjo una inhibición en el desarrollo, que aumentó a medida que crecía la concentración de los biocidas. A los 15 días de incubación con 50 ppm de los herbicidas, todas las cepas fueron inhibidas (ver Figura 9 como ejemplo).

Acercas de este efecto, Esuruoso (1968) realizó observaciones similares. Los agroquímicos estudiados son insolubles en agua, y al colocarlos en medios de cultivo, posiblemente a través de las macromoléculas presentes, se harían más disponibles a los propágulos fúngicos. También es probable que las sustancias nutritivas del medio Sabouraud Glucosa alteren la susceptibilidad de los propágulos a los herbicidas.

Esto es una prueba más de las interrelaciones que se producen entre distintas sustancias, las que finalmente pueden modificar la micota de los suelos. Los estudios realizados in vitro son sólo una aproximación a los complejos procesos que ocurren en los habitats naturales, y que por lo tanto, necesitan profundizarse para interpretar alteraciones tan importantes como las observadas en el laboratorio.

CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones de trabajo descritas, la germinación y el crecimiento fueron afectados significativamente por la presencia de los herbicidas probados.

2. En lo que respecta a la germinación la Atrazina, mostró un efecto depresivo significativamente menor que el producido por los otros dos herbicidas.

Alachlor en cambio produjo la más brusca disminución de la germinación a menor concentración y en general, el porcentaje de germinación resultó significativamente menor que con Atrazina. Finalmente Metribuzin tuvo un efecto intermedio entre los otros dos herbicidas.

3. En cuanto al crecimiento, se observó que a 5

ppm, Metribuzin era el único biocida que no disminuía significativamente el promedio de diámetro para las cepas, excepto para *K. ajelloi*. A una concentración de 25 ppm, se logró inhibición total de las tres cepas con Alachlor y Metribuzin, mientras que Atrazina permitió el crecimiento a todas las concentraciones probadas, sin depresiones significativas a partir de los 5 ppm.

4. Estos efectos depresivos e inhibitorios del crecimiento se produjeron sólo cuando los hongos eran tratados con los herbicidas en medio de cultivo Sabouraud Glucosa, y no en suspensiones acuosas.

MICROSPORUM FULVUM

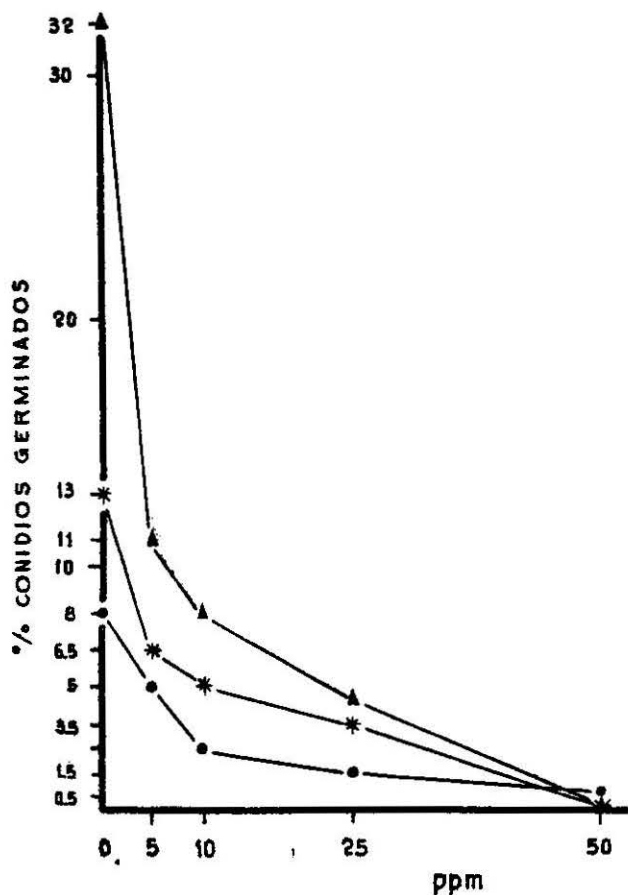


FIGURA Nº 1 METRIBUZIN

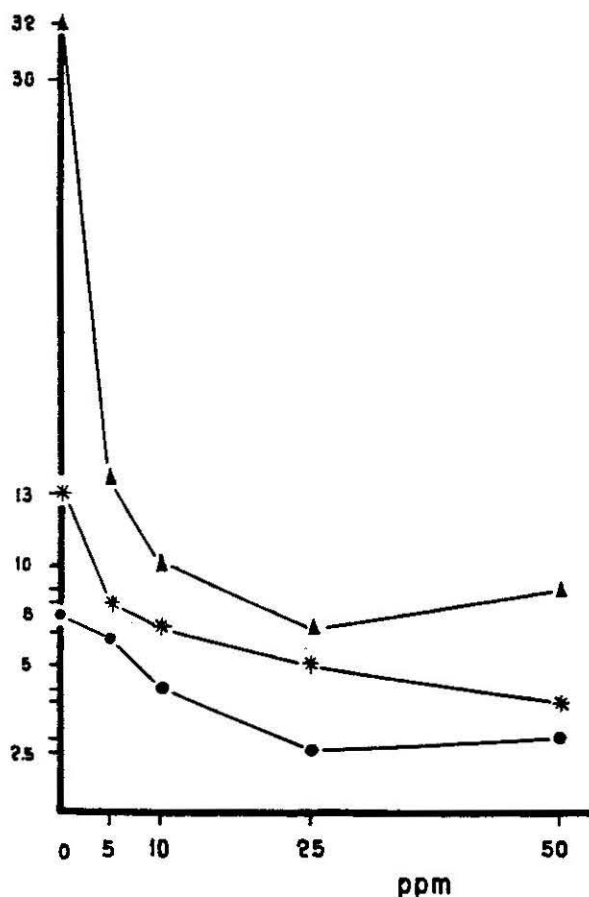


FIGURA Nº 2 ATRAZINA

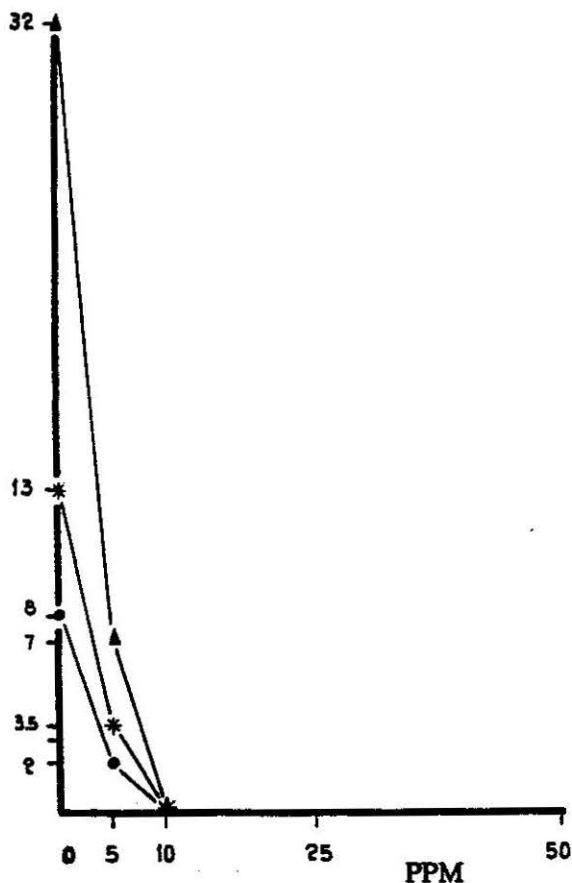


FIGURA Nº 3 ALACHLOR

(Figuras 1 a la 5)

Influencia de los herbicidas sobre la germinación, porcentaje de conidios germinados (valores promedio de determinaciones realizadas por duplicado) en función de la concentración de biocidas, a las ● 6 Hrs., * 9 Hrs. y ▲ 12 Hrs. de incubación.

MICROSPORUM GYPSEUM

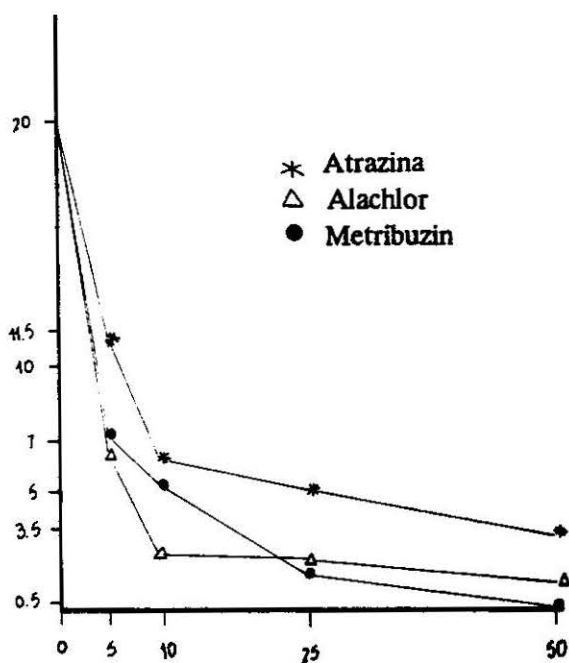


FIGURA Nº 4

KERATINOMYCES AJELLOI

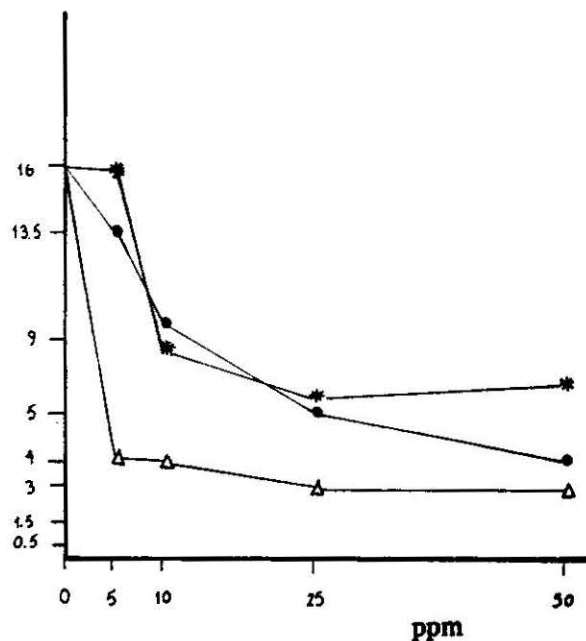


FIGURA Nº 5

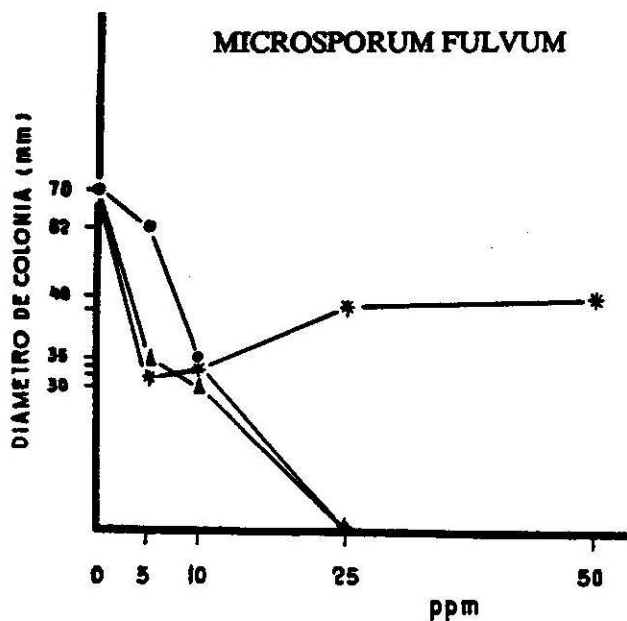


FIGURA Nº 6

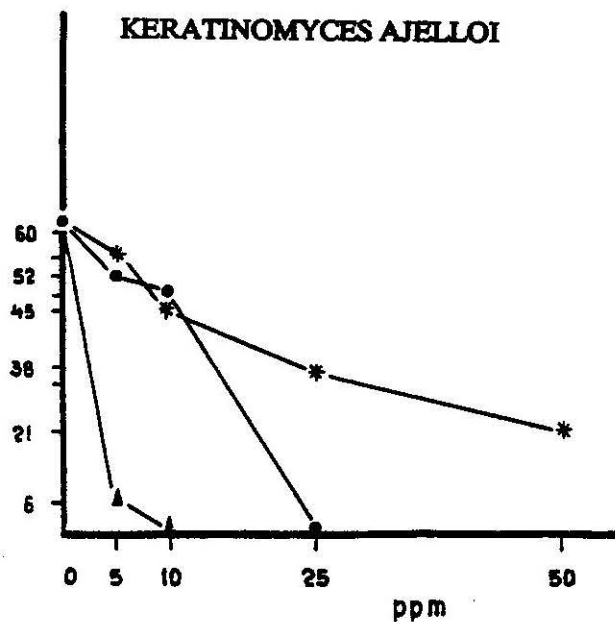


FIGURA 8

(Figuras 6 - 7 - 8)

Efecto de los herbicidas (* Atrazina, ■ Metribuzin y ▲ Alachlor) en Agar Sabouraud - Glucosa sobre el crecimiento de las cepas a los 15 días de siembra.

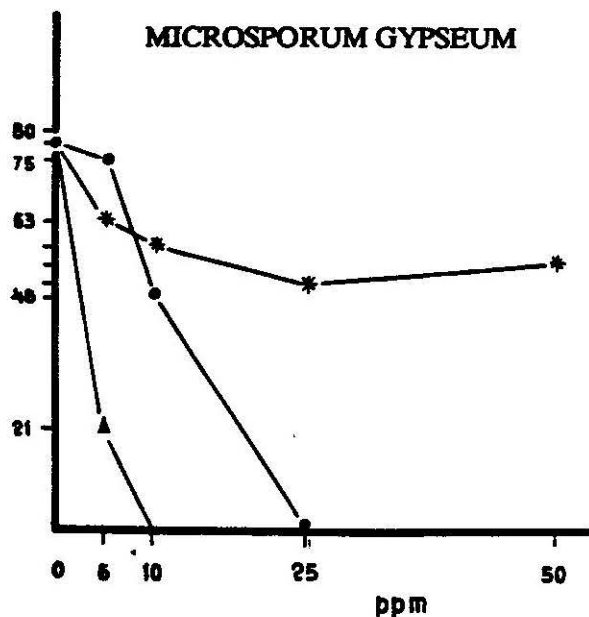


FIGURA 7

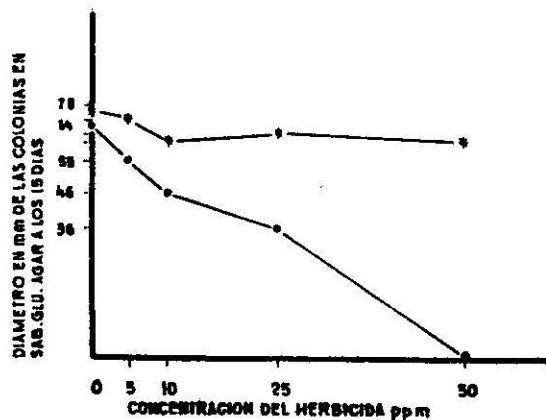


FIGURA 9

Influencia de Atrazina sobre el crecimiento de Keratinomyces ajelloi, los propagulos fueron incubados previamente 48 hrs. con el Herbicida en * agua y en ■ Sabourand glucosa líquido.

REFERENCIAS

- 1) Álvarez, D.P.; Luque, A.G. y Marini, P. (1986). Influencia de herbicidas sobre la micota queratinolítica de los suelos. *Boletín Micológico*, 3: 81-85.
- 2) Esurioso, O.F.; Price, T.V. and Wood, R.K.S. (1968). Germination of *Botrytis cinerea* conidia in the presence of Quitozene, Tecnazene and Richloran. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 51: 405-410
- 3) Hodges, C. F. (1977). Postemergent herbicides and the biology of *Drechslera sorokiniana*: effects on conidial germination, vegetative growth and reproduction. *Mycologia*, 69: 1083-1094.
- 4) Huber, S.J.; Poschenrieder, G.; Wallnöfer, P.R. (1980). Effect of pesticides and the corresponding metabolites on growth and respiration of some soil microorganisms. *Journal of Plant Diseases and protection* 87: 533-545.
- 5) Kaufman, D.P. and Kearney, P.C. (1977). Microbial Transformations in the soil. *Soil Microbiology* 3a. ed. Alexander M., Wiley J. and Sons, Inc. cap. 2, p: 29.
- 6) Kuthuhitbeen, A.J. and Pug, G.J.F. (1977). The effects of fungicides on the growth rates of Thermophilous fungi. *Mycopathologia*, 62: 67-76.
- 7) Smith, S.N. and Lyon, A.J.E. (1976). The uptake of Paraquat by soil fungi. *New Phytol.* 76: 479-484.
- 8) Williams, J.I. (1975). Resistance of *Chrysosporium pannorum* to an organomerary fungicide. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 64: 255-263.