



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE *Pilobolus* sp.
PARA REMOVER METIL PARATIÓN EN
MICROHABITATS DE CULTIVOS DE MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

P R E S E N T A:

BIÓL. LUIS ANTONIO VAJE ROMERO

DIRIGIDA POR:

DRA. PATRICIA BALDERAS HERNÁNDEZ

DR. MOISÉS TEJOCOTE PÉREZ

DRA. GABRIELA ROA MORALES

Toluca, México, 6 de Noviembre de 2015

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Química Ambiental del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia Balderas Hernández y Dra. Gabriela Roa Morales; además del laboratorio de Micología del Centro de Investigación en Recursos Bióticos de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo la dirección del Dr. Moisés Tejocote Pérez. El área de investigación fue la de Calidad Ambiental y línea fue la de prevención, control y efectos de la contaminación ambiental y el número de registro del protocolo de investigación ante la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEM fue MACIAS-1314.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada para la realización de este proyecto, 556073.

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN	5
3.	ANTECEDENTES	8
3.1.	Tratamientos biológicos.....	10
3.2.	Micorremediación	12
3.3.	Contaminación por plaguicidas	13
3.7.	Síntomas.....	18
3.8.	Cultivo de maíz	20
3.9.	<i>Pilobolus</i> sp.....	21
4.	JUSTIFICACIÓN	23
5.	HIPOTESIS	25
6.	OBJETIVOS	27
6.1.	General.....	27
6.2.	Particulares.....	27
7.	METODOLOGÍA	29
7.2.	Obtención de inóculo de <i>Pilobolus</i> sp.	30
7.3.	Obtención de semillas y plántulas de maíz	30
7.4.	Solución de metil paratión	31
7.5.	Sistemas Experimentales	32
7.6.	Concentración de clorofila a, b y carotenos en plántulas de maíz	33
7.7.	Determinación de la concentración de metil paratión.....	34
7.8.	Análisis estadístico	35
8.	RESULTADOS	37
a)	Modificación del fotoperíodo de <i>Pilobolus</i> sp.	61
b)	Artículo científico titulado “Biological translocation of parathion methyl by <i>Pilobolus</i> sp in corn microsystems” enviado a la revista Fungal Biology.....	37
9.	DISCUSIÓN	63
10.	CONCLUSIONES	66
11.	REFERENCIAS	68

RESUMEN

RESUMEN

Uno de los problemas más preocupantes relacionados con la contaminación del suelo y agua, en zonas agrícolas y florícolas, es el uso no controlado de plaguicidas entre ellos el metil paratión (compuesto organofosforado) de importancia agrícola. Para resolver estos problemas en suelo y agua, es necesario utilizar métodos eficientes, económicos y sustentables para la remoción de los contaminantes. Algunos tratamientos utilizan plantas y bacterias que remueven, degradan o transforman sustancias tóxicas, sin embargo es necesario ampliar este panorama y experimentar con otro tipo de organismos como los hongos para implementar nuevas propuestas de tratamiento y remoción de contaminantes. En este sentido, en el presente estudio se evaluó la eficiencia del hongo coprófilo *Pilobolus* sp para remover metil paratión en sistemas agrícolas experimentales de maíz. El experimento se realizó con seis tratamientos, el primero fue el control: maíz sembrado en suelo con estiércol (sustrato), el segundo y tercer tratamiento consistieron en colocar plantas de maíz en expuestas a concentraciones de 50 y 100 mgL⁻¹ de metil paratión (MP) en el sustrato, el cuarto y quinto tratamiento era de planta, MP a concentraciones de 50 y 100 mgL⁻¹ respectivamente y *Pilobolus* sp. , el sexto maíz, sustrato y *Pilobolus* sp. Se determinó la producción de clorofilas, carotenos y cantidad de biomasa en las plantas para conocer el efecto del plaguicida después de 12 días de exposición. Los resultados mostraron que la presencia del hongo actúa de manera positiva en los procesos fisiológicos de las plantas, encontrando diferencias significativas entre los tratamientos, plantas sin *Pilobolus* y con inóculo, ambas expuestas a metil paratión ($p < 0.05$). Se observó que el hongo tiene la capacidad de eliminar al metil paratión y mejorar la producción de los pigmentos y de la biomasa en las plantas de maíz, se infiere que el proceso de biorremediación es a nivel enzimático ya sea dentro o fuera del hongo.

ABSTRACT

One of the most worrying problems related to soil and water pollution, agricultural and floriculture areas, is the uncontrolled pesticides including methyl parathion (organophosphorus compound) use of agricultural importance. To solve these problems in soil and water, you must use efficient, affordable and sustainable for the removal of contaminants methods. Some treatments using plants and bacteria that remove, degrade or transform toxic substances, however it is necessary to extend this background and experience with other organisms such as fungi to implement new proposals for treatment and removal of contaminants. In this sense, in this study the efficiency of the fungus *Pilobolus* sp. *coprófilo* assessed to remove methyl parathion in experimental maize farming systems. The experiment was conducted with six treatments, the first was in control: maize planted in soil with manure (substrate), the second and third treatment consisted of placing corn plants exposed to concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹ of methyl parathion (MP) in the substrate, the fourth and fifth treatment plant was MP at concentrations of 50 and 100 mg L⁻¹ respectively and *Pilobolus* sp. The sixth corn substrate and *Pilobolus* sp. Production of chlorophylls, carotenoids and quantity of biomass in plants to know the effect of the pesticide after 12 days of exposure were determined. The results showed that the fungus acts positively on the physiological processes of plants, finding significant differences between treatments, plants without *Pilobolus* and inoculum, both exposed to methyl parathion ($p < 0.05$). It was observed that the fungus has the ability to remove the methyl parathion and improve production of pigments and biomass in corn plants, it follows that the bioremediation process is enzymatic level either inside or outside the fungus.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El ambiente sufre un gran deterioro debido al crecimiento tan acelerado de la población humana, industria y al uso inadecuado de algunas sustancias como son los plaguicidas aplicados a cultivos, que surgen con el desarrollo masivo de la agricultura y la agroindustria y que han provocado contaminación en el agua, suelo y aire (Bumpus *et al.* 1999; García, 2005; Sánchez, 2010).

El uso indiscriminado de plaguicidas está orientado hacia organismos blanco específicos, sin embargo, también se afectan organismos no blanco como son algunos insectos y mamíferos incluyendo al hombre que diariamente están expuestos a dosis desconocidas de estos agresores potenciales y aunque los organismos pueden tolerar algunos niveles de contaminantes, no se pueden conocer exactamente los efectos crónicos que estos pueden producir, especialmente los compuestos organofosforados que ejercen una acción sistémica. (CICOPLAFEST, 1998; Murcia y Stashenko, 2008; Sánchez, 2010).

Los plaguicidas organofosforados son ampliamente utilizados en la agricultura; el metil paratión es un insecticida organofosforado de contacto y/o sistemático que tiene un enlace P=S por lo que puede combinarse con gran afinidad con cierto tipo de esterasas (transmisores nerviosos) y provocar su inactivación. (García, 2005; Velázquez, 2013).

Los cultivos de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) pueden acumular en sus tejidos concentraciones altas de contaminantes y en menor

cantidad en sus granos, si están influenciadas por el riego con aguas residuales o expuestas a plaguicidas, lo que se denomina como bioacumulación (Vazquez-Alarcon *et al.* 2004).

Además, se ha detectado metil paratión en cuerpos de agua, lo que provoca alteraciones fisiológicas y bioquímicas en crustáceos y peces, por ejemplo Archana y Vidal en 2011 reportan concentraciones de 5.98–10.89 mgL⁻¹ en peces Guppis (*Poecilia reticulata*); también se ha encontrado en agua potable y alimentos, los cuales representan un peligro para el hombre debido a su bioacumulación (De la Vega, 1997).

Con base en lo anterior, el problema de contaminación del agua, suelo y de algunos organismos afecta a la toda la población, por lo cual es necesario desarrollar y buscar alternativas tecnológicas adecuadas, eficientes, efectivas y de bajo costo, acopladas a procesos físicos, químicos y microbiológicos para el control de la contaminación por metil paratión; el presente trabajo tiene como finalidad aplicar y evaluar el desempeño de *Pilobolus* sp. como biosorbente de metil paratión en microhábitats de cultivos de maíz.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

Plaguicidas y la problemática ambiental

Los plaguicidas están estrechamente relacionados con la historia de la agricultura, ya que su tecnificación se presentó más contundente y homogénea desde la llegada de los españoles, pues anterior a este suceso la técnica que se había desarrollado para los cultivos agrícolas prehispánicos se basan en el sistema de milpa (policultivo). Con la llegada de los españoles se presenta una introducción de la técnicas europeas empleadas en la agricultura basadas principalmente en el monocultivo y en herramientas de metal entre otras técnicas que favorecieron el cambio espacial de la agricultura, también se introdujo la ganadería teniendo un alto impacto en la transformación del espacio hasta el punto de terminar con la fertilidad del suelo por la erosión y la pérdida de la cubierta vegetal por el sobrepastoreo (Aguilar y Catherine, 2003; González, 2006).

Con el desarrollo de la agricultura surge la presencia de organismos considerados como plaga definidos como “cualquier organismo que a determinado nivel de población o inóculo, compite y puede causar daño económico sobre otra especie animal o vegetal cultivada en cualquiera de las etapas de crecimiento, desarrollo, producción o manejo posterior”, dichos daños ocasionados por las plagas y las enfermedades han asolado a los agricultores, entre los cuales pueden ser económicos como pérdida de productividad, ingresos e inversiones (SINAVEF, 2009).

En la década de los 40's comenzó la época de los insecticidas organoclorados y organofosforados, estos y algunos herbicidas hormonales sintéticos que se desarrollaron subsecuentemente, parecieron ser tan exitosos en el control de las plagas que fueron adoptados rápidamente para su uso, e impulsaron el surgimiento de una industria agroquímica (Rodríguez *et al*, 2000).

Por ejemplo con la introducción del DDT y de otros plaguicidas organoclorados en la década de los 40's, se inició la aplicación intensiva de plaguicidas sintéticos y de esta manera, el combate de plagas se convirtió en la acción estratégica más importante para lograr altas cosechas, y la aplicación de plaguicidas como la medida más rentable para los intereses económicos del productor lo cual facilitó la introducción en la agricultura mexicana de un número creciente de plaguicidas, siendo no solo la importación de los insumos sino también la fabricación y formulación local de numerosos compuestos para su uso generalizado en extensas regiones de agricultura (Rodríguez *et al*, 2000; Albert, 2005).

Tras este periodo de modernización y tecnificación de la agricultura mexicana viene lo que se conoce como la Revolución Verde, la cual hace referencia a un modelo implementado en la agricultura a fin de obtener mayores rendimientos, generar altas tasas de productividad agrícola sobre la base de una producción extensiva de gran escala y el uso de alta tecnología. La búsqueda de altos rendimientos implicó el monocultivo, con la consecuente erosión genética de las principales variedades agrícolas (Ceaccon, 2008; González, 2006).

Sin embargo, todo ese avance tecnológico en la agricultura trajo consigo también consecuencias tales como, incremento en el número de plagas y por tanto en el consumo de

plaguicidas, formando una relación directa entre el consumo de plaguicidas y el número de plagas; con ello se vertieron agroquímicos sin medida al suelo y al agua hasta niveles peligrosos, al mismo tiempo el consumo de fertilizantes aumentó mientras que la productividad no era tan considerable (González, 2000).

Con base en toda la problemática descrita referente al uso de plaguicidas, es necesario la implementación de alternativas para mitigar o eliminar la contaminación en el ambiente, una propuesta son los tratamientos biológicos, los cuales se describen a continuación.

2.1. Tratamientos biológicos

Algunos autores como Etcharren (2005), Rodríguez *et al.* (2006), Buitrón *et al.* (2007) y Tejocote-Pérez (2010) impulsan los tratamientos biológicos, los cuales utilizan la capacidad de los organismos para la remoción o transformación de contaminantes en sustancias biodegradables que no originen problemas de ecotoxicidad. De acuerdo con Arnáiz *et al.* (2003), los tratamientos biológicos tienen mayores rendimientos con menores costos económicos de explotación y mantenimiento, pueden llegar a destruir completamente los contaminantes, transformándolos en sustancias inocuas o compuestos asimilables; los costos de inversión de los tratamientos biológicos son de 5 a 20 veces menores que los químicos y los costos de tratamiento son de 3 a 10 veces menores.

Algunos autores que se mencionan a continuación han realizado estudios implicados en los tratamientos biológicos.

Pokhrel y Viraraghavan (2006), realizaron un estudio de remoción de Arsénico de soluciones acuosas utilizando biomasa fúngica (*Aspergillus niger*) y obtuvieron una remoción máxima del 95 % con un valor de pH de 6.

Rodríguez *et al.* (2008), realizaron un experimento acerca del efecto de las condiciones de operación sobre la biosorción de plomo, cadmio y cromo utilizando *Saccharomyces cerevisiae* residual y logrando un porcentaje de remoción de plomo del 56 % y destacan que a mayor cantidad de biomasa es mayor la retención de iones metálicos.

Larenas *et al.* (2009), realizaron un experimento con desechos de jardín para la biosorción de plomo, utilizando diferentes concentraciones 50, 70, 100, 500 y 1000 ppm; analizaron características de sorción en función del valor de pH y tiempo de biosorción, siendo el valor de pH óptimo de 6.0 y la mayor tasa de sorción entre 15 y 30 minutos, siendo la tasa de remoción de 182 mg plomo/g biosorbente.

Sánchez-Sánchez (2012), realizó un estudio de biorremediación de efluentes industriales utilizando *Salix Babylonica* en hidroponía y obtuvo eficiencias en disminución de color de un 38 %, de turbidez de 77 % y DQO de 65%.

La mayoría de los estudios de biorremediación utilizan principalmente bacterias y plantas, sin embargo una importante rama de esta área es la micorremediación o remediación con hongos de la cual no se han realizado muchos estudios, por lo cual es importante ampliar el conocimiento sobre esta área y realizar estudios con diferentes especies fúngicas.

2.2. Micorremediación

La micorremediación es el uso de hongos para degradar o remover toxinas del ambiente. En suelos contaminados, su práctica involucra el inóculo de micelios, su introducción sobre un material soporte de origen vegetal, la estimulación selectiva del desarrollo de especies autóctonas o combinación de estas estrategias (Medaura *et al.* 2013).

A diferencia de las bacterias, los hongos, son, frecuentemente, más competentes en cometabolismo y bioacumulación que utilizando los xenobióticos como única fuente de carbono y la naturaleza extracelular de sus enzimas (lacasa, lignina-peroxidasa y manganeso- peroxidasa), explican su superioridad en términos de biodegradación, es así que la utilización de hongos para la biorremediación de suelos contaminados, denominada remediación fúngica o micorremediación representa una alternativa de gran potencial (Pointing, 2001; Medaura *et al.* 2013)

Para incrementar la actividad de los microorganismos se utilizan dos estrategias: a) *bioestimulación*: incrementa la actividad de las poblaciones microbianas nativas mediante el agregado de nutrientes y/o aceptores terminales de electrones; b) *bioaumentación*: involucra la adición de cepas microbianas con capacidad de degradar las moléculas tóxicas de interés. Ésta puede utilizar microbiota nativa, como hongos filamentosos, quienes podrían presentar ventajas sobre la bioaumentación bacteriana, siendo técnicamente factible y prometedora (Sasek *et al.* 1998; Atagana, 2004; Medaura *et al.* 2013).

Giubilei *et al.* 2009 realizaron un estudio de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos con *Phlebia* sp. y *Allescheriella* sp., posteriormente Karpouzas *et al.* 2014 realizaron un estudio del efecto de nicosulfuron sobre la abundancia y diversidad de hongos micorrízicos arbusculares y su utilización como indicadores de toxicidad de plaguicidas del suelo.

2.3. Contaminación por plaguicidas

Los plaguicidas comprenden un grupo amplio de sustancias tóxicas que han sido diseñadas con el propósito de controlar o erradicar diferentes tipos de organismos que producen efectos nocivos sobre las plantas y animales de utilidad para el hombre, las cuales en términos coloquiales son denominadas plagas (Albert, 2005; Velázquez, 2013).

La agricultura es una actividad donde se descargan intencionadamente en el ambiente productos químicos para desaparecer algunas formas de vida. Después de la aplicación de plaguicidas en suelos y/o vegetales, se calcula que solo el 10 % llega al organismo blanco y el 90 % restante se dispersa en los ecosistemas principalmente por escorrentía superficial, riegos, infiltración, de manera suspendida en el aire y por acumulación en el suelo (García 2005; Tiwari *et al.* 2013).

Los plaguicidas se han caracterizado por su toxicidad y su persistencia en los ecosistemas, los organofosforados son más tóxicos y menos persistentes, sin embargo su uso excesivo ha

permitido que estén presentes en las cadenas tróficas (incluida la del hombre) por lo cual se puede decir que tienden a acumularse (Muttray *et al.* 2005; Tiwari *et al.* 2013).

Las vías principales por las que los plaguicidas llegan al suelo, agua, aire o plantas son: por su aplicación directa en el suelo o partes aéreas de las plantas, a partir de esto puede producirse un arrastre por el agua (lixiviación y/o escorrentía) y provocar la contaminación de cuerpos de agua, con el viento se pueden volatilizar los plaguicidas a la atmosfera en donde son dispersados y posteriormente depositados por la acción del viento o por precipitación en forma de lluvia (Cornejo, 2001; Ramos, 2006).

De esta manera, los plaguicidas presentes en el agua y algunas plantas, pueden pasar directamente como contaminantes en algunos alimentos; el consumo de alimentos contaminados con plaguicidas produce problemas neurológicos por la inhibición permanente de la enzima colinesterasa, ya que al fosforilarse esta enzima impide la separación de la acetilcolina que funciona como transmisor nervioso (García *et al.* 2003; Muttray *et al.* 2005; Velázquez, 2013); debido a esta problemática, es necesario aplicar e innovar técnicas que mitiguen o remuevan plaguicidas presentes en el ambiente, como es el caso del metil paratión.

2.4. Metil paratión

El metil paratión (figura 1), es un compuesto perteneciente a la familia de los organofosforados, ampliamente utilizado en nuestro país y está clasificado como extremadamente peligroso por la OMS. Es generalmente aplicado en forma de aerosol, donde puede contaminar suelo y aguas superficiales y constituir un peligro potencial tanto para los animales como para el ser humano. Puede descomponerse en productos de degradación como el metil paraoxón que es incluso más tóxico que el compuesto original y a pH alcalino se degrada a p-nitrofenol, otro compuesto tóxico y más persistente que el propio metil paratión (Diagne *et al*, 2007).

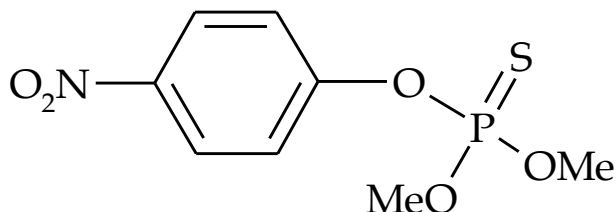


Figura 1. Estructura del metil paratión (PDS 7, Parathion-methyl, Data Sheets on Pesticides No. 7 Rev.1, IPCS Inchem WHO, FAO)

Es utilizado ampliamente en agricultura, jardinería e industria, en su forma comercial se vende como Folidol 2 %, Folidol M-50, Folidol M-72, etc., y la aplicación excesiva de estos productos a los cultivos ha generado problemas de ecotoxicidad en el suelo, agua, aire y algunos organismos incluyendo al hombre, siendo la población infantil la más susceptible, ya que, incluso a dosis bajas de metil paratión se afecta el desarrollo del sistema nervioso (Silva *et al*. 2004; Murcia y Stashenko 2008).

2.4.1. Fuentes de Exposición

La exposición a esta sustancia se clasifica en dos categorías generales: la ocupacional y la ambiental. Las exposiciones ocupacionales se producen en agricultores, obreros industriales, exterminadores de plagas y otros trabajadores. La exposición que no es de tipo ocupacional afecta a un amplio sector de la población general. Las exposiciones residenciales obedecen al uso de plaguicidas organofosforados por exterminadores de plagas y habitantes del hogar, o son de carácter alimentario o accidental. Otras exposiciones ambientales se observan en lugares públicos y en la vecindad de granjas, o bien como resultado del uso de productos organofosforados en casos de guerra química o de terrorismo (Jaga y Chandrabhan, 2003).

2.4.2. Toxicocinética

2.4.2.1. Absorción

Los organofosforados ingresan al organismo por las vías: Cutánea, Respiratoria, y Digestiva.

1. Cutánea: Las propiedades liposolubles y del tipo de disolvente o excipiente que se emplea para soportar el ingrediente activo (parte biológicamente activa del plaguicida), unidos a las frecuentes lesiones cutáneas que suele presentar el individuo que las manipula, facilitan su penetración por esa vía.

2. Respiratoria: Por inhalación se absorben cuando se trabaja durante su formulación, mezcla, aplicación o almacenamiento, o cuando se producen incendios o derrames.

3. Oral: El ingreso por vía oral ocurre mediante ingestión voluntaria o accidental, o por alimentos que hayan sido excesivamente expuestos a estos plaguicidas.

Las dos primeras constituyen las rutas más comunes de penetración en intoxicaciones laborales y la última es más frecuente en intoxicaciones de otro origen (González, 1995).

2.4.2.2. Distribución

Una vez absorbidos, los organofosforados y sus metabolitos, se distribuyen rápidamente por todos los órganos y tejidos. Las concentraciones más elevadas se alcanzan en el hígado y en los riñones. Pueden almacenarse en los tejidos grasos y en el tejido nervioso dado su riqueza en lípidos.

2.5. Biotransformación

La vida media de los compuestos organofosforados y de sus productos de biotransformación, es decir, de conversión metabólica, es relativamente corta. Dicho proceso de transformación se lleva a cabo mediante la presencia de enzimas oxidasas, hidrolasas y glutatión-s-transferasas, principalmente hepáticas y puede dar como resultado metabolitos más tóxicos, (González, 1995).

2.6. Toxicidad

Tanto la colinesterasa eritrocítica como la sérica se ven inhibidas por los plaguicidas organofosforados. La ChE sérica se inhibe con mayor rapidez y sus niveles normales se restablecen en 60 días, siendo este un indicador de intoxicación aguda por plaguicidas. La actividad de RBC ChE se deprime de manera menos rápida y toma desde algunas semanas hasta meses en restablecer el nivel normal, (González, 1995).

El mecanismo se asocia con la inhibición de la acetil-colinesterasa, la enzima responsable de la destrucción y terminación de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina. Con la acumulación de la acetilcolina se altera el funcionamiento normal del impulso nervioso. En el caso de algunos organofosforados se inhibe también la esterasa neuropática (NTE) y esta inhibición, junto con el incremento del Ca^{2+} intracelular por alteración de la enzima calcio-calmodulina-quinasa II, parecen constituir el mecanismo de producción de la neuropatía retardada. La NTE puede ser utilizada como un biomarcador de efecto, predictor del desarrollo de neuropatía periférica retardada inducida por organofosforados (Pitarch, 2001).

2.7. Síntomas

a) Agudos: inhibición de la colinesterasa, afecta el sistema nervioso, hormigueo, aturdimiento, dolor de cabeza, visión borrosa, vértigo, temblor, náuseas, dolor abdominal, dificultad respiratoria, disminución del ritmo cardiaco, pérdida del conocimiento y la muerte (García *et al.* 2003; Tiwari *et al.* 2013).

b) Crónicos: en personas expuestas aparece una ligera disminución de la colinesterasa, en experimentos que se han realizado con ratones causa supresión de crecimiento fetal, huesos y la muerte (García *et al.* 2003; Tiwari *et al.* 2013).

A continuación se mencionan algunos estudios relacionados con metil paratión en suelo.

AUTOR	ARTICULO	APORTACIÓN
Zuo et al. 2015	Uso de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 para la degradación de organofosforados y piretroides y su aplicación en biorremediación de suelos	Los plaguicidas organofosforados y piretroides pueden ser degradados en 15 días inoculando el suelo con <i>Pseudomonas putida</i> KT2440
Rojas et al., 2012 México	Efecto de paratión metílico sobre la producción de óxido en suelo.	El plaguicida paratión metílico afectó las emisiones de NO ₂ y CO ₂ , lo que disminuye la actividad microbiana del suelo.
Ortiz y Sánchez, 2010. México	Biodegradación de organofosforados en suelos de México.	Las bacterias son importantes organismos que intervienen en la degradación del plaguicida paratión metílico, recomendándose usar como método de remediación.
Masís <i>et al.</i> , 2008	Residuos de agroquímicos en suelo	21 plaguicidas organoclorados y organofosforados analizados entre ellos metil paratión, solo 3 organoclorados detectados y un organofosforado
Hernández <i>et al.</i> , 2003	Residualidad de insecticidas en suelo de cultivos de arroz.	Los insecticidas encontrados deltametrin, carbarilo y paratión metílico, no rebasaron el límite de detección del método cromatográfico
Sharmila, 2002	Persistencia de metil paratión en suelo (in vitro)	La persistencia de metil paratión (MP) en un suelo inundado aluvial disminuyó al aumentar la temperatura

Belanger, 1998	Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos de Canadá.	Se encontraron residuos altos de plaguicidas organoclorados (aldrin, dieldrin, endulsofan, endrin, heptacloro y y-clordano) y de organofosforados (diazinon, leptofos, etión, diclorofention y paratión).
----------------	---	---

2.8. Cultivo de maíz

El cultivo de maíz (*Zea mays*) en México está ligado a nuestra historia desde tiempos remotos y es aquí donde se presenta el mayor consumo per cápita en el mundo; siendo el centro primario de su origen, domesticación y dispersión a otras regiones de América desde hace aproximadamente 5 millones de años; a esto se atribuye que en la actualidad en este país se encuentre la mayor diversidad genética de esta planta (García 2004; Aguilar 2008).

Vázquez-Alarcón *et al.* (2004), reportaron concentraciones altas de plaguicidas y metales pesados en los tejidos vegetales de maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*) y alfalfa (*Medicago sativa*) y en menor cantidad en sus granos, debido a que son regadas con aguas residuales o están expuestas a plaguicidas; es por eso que es necesario aplicar un tratamiento para disminuir las concentraciones de dichos contaminantes, principalmente en cultivos de maíz.

2.9. *Pilobolus* sp

Pilobolus sp (figura 2) es un organismo coprófilo que se desarrolla en estiércol de animales herbívoros (bovinos, equinos, etc.) debido a la necesidad que tiene de disponer tanto de sales de amonio o de amoniaco, que son la mejor fuente de nitrógeno, como de un factor de crecimiento llamado coprógeno, compuesto orgánico de hierro. Presenta esporangios sobre unos esporangióforos bastante característicos, se desarrollan a partir de un trofociste, hinchado y rico en carotenos formando una vesícula, la cual siempre orienta el esporangioforo hacia el sol, en el interior de la vesícula existe una presión, de forma que cuando las condiciones son adecuadas se dispara, dispersando el esporangio a una distancia de hasta 2 metros (Herrera y Ulloa 1998 y Rubio 2006).

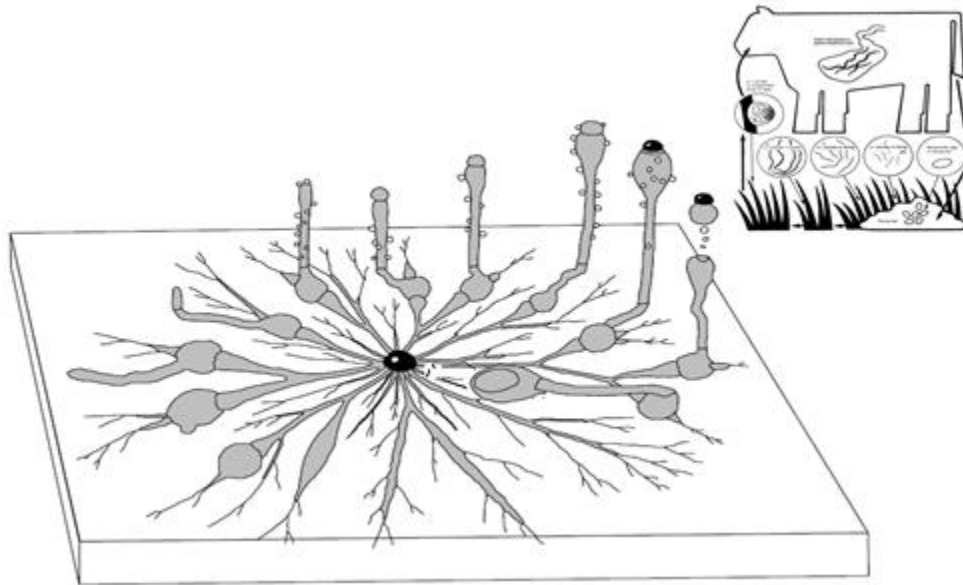


Figura 2. Ciclo de vida de *Pilobolus* sp (Rubio 2006)

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Las zonas agrícolas son áreas vulnerables de contaminación por metil paratión debido a su uso excesivo, es un contaminante que al estar presente en cuerpos de agua y/o suelo, provoca alteraciones fisiológicas y bioquímicas en los organismos debido a su bioacumulación; también se ha encontrado en agua potable y alimentos, los cuales representan un peligro para el hombre por que causa problemas tóxicos como inhibición de la colinesterasa, afectando el sistema nervioso, bajo este criterio es inminente la contaminación por metil paratión, lo que dio la pauta para desarrollar e innovar nuevas tecnologías que nos ayuden a mitigar los problemas de ecotoxicidad. Una alternativa potencial para remover metil paratión son los tratamientos biológicos que utilizan la capacidad de los organismos para eliminar o transformar contaminantes; por esta razón en este trabajo se propuso utilizar *Pilobolus* sp. in vivo, que es un organismo coprófilo que se propaga con facilidad en estiércol de bovinos y que este a su vez puede ser enmendado a cultivos de maíz como una alternativa de material biosorbente o biotransformador potencial para remover metil paratión de microhábitats de cultivos de maíz.

HIPÓTESIS

4. HIPOTESIS

El tratamiento experimental con *Pilobolus* sp ante las concentraciones de metil paratió de 50 y 100 ppm en los microhábitats de cultivo de maíz disminuye la concentración del plaguicida.

OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar el desempeño de *Pilobolus* sp. para eliminar metil paratión en microhábitats experimentales de cultivos de maíz.

5.2. Particulares

- Obtener de la cepa de *Pilobolus* sp. a partir de excremento de ganado bovino.
- Diseñar los microhábitats de cultivos de maíz en macetas, utilizando semillas de maíz (*Zea mays*) colectadas de la localidad de Zinacantepec, Estado de México.
- Enmendar el inóculo en los microhábitats de cultivos de maíz aplicando diferentes concentraciones graduales de metil paratión, una vez obtenido el cultivo de *Pilobolus* sp.
- Determinar la concentración de metil paratión a nivel de biomasa de *Pilobolus* sp, biomasa de maíz y suelo mediante Espectrofotometria UV-Vis.

METODOLOGÍA

6. METODOLOGÍA

6.1. Muestras de suelo agrícola para montar los sistemas

Las muestras de suelo agrícola se recolectaron directamente de la capa arable de una zona forestal con características aptas para el cultivo de maíz, esta zona se ubicó en las faldas del Volcán Nevado de Toluca, en el municipio de Zinacantepec, Estado de México, durante el periodo de agosto de 2013 a julio de 2014 (figura 3), la toma de muestra se hizo a 20 cm de profundidad en el horizonte orgánico. El suelo seleccionado fue de tipo andosol ya que este es muy común para el cultivo de maíz, las muestras recolectadas fueron forestales porque se requirió que estén libres de plaguicidas o que nunca hayan tenido contacto con plaguicidas para evitar una interferencia química con el metil paratión. Se recolectó una cantidad aproximada de 1 Kg de suelo, se colocó en bolsas de plástico para su traslado al laboratorio.



Figura 3. Zona de toma de muestra de suelo agrícola, Zinacantepec, México.

6.2. Obtención de inóculo de *Pilobolus* sp.

De las mismas zonas de muestreo de suelo agrícola y durante las mismas fechas, se recolectaron muestras de excremento de ganado bovino (figura 4), 1 Kg por muestra, se colocaron en recipientes herméticos y se llevaron al laboratorio para su procesamiento, se caracterizó el excremento en fresco considerando el valor pH y humedad relativa, en estos procedimientos se consideraron las aportaciones de Tejocote-Pérez *et al.* 2012.



Figura 4. Muestra de estiercol de ganado bovino para obtener la cepa de *Pilobolus*.

6.3. Obtención de semillas y plántulas de maíz

Se recolectaron semillas de maíz cacahuazintle que se utiliza para los cultivos aledaños a la zona de muestreo, las semillas se limpiaron para eliminar los residuos de materia orgánica y se colocaron en una estufa a 28 °C por 2 días para eliminar la humedad externa. Las plántulas se obtuvieron por germinación directa en suelo agrícola de los tratamientos

montados en cada sistema. Se eligió la variedad cacahuazintle (figura 5) porque de acuerdo con Aguilar 2008, esta presenta una mayor tasa de crecimiento.

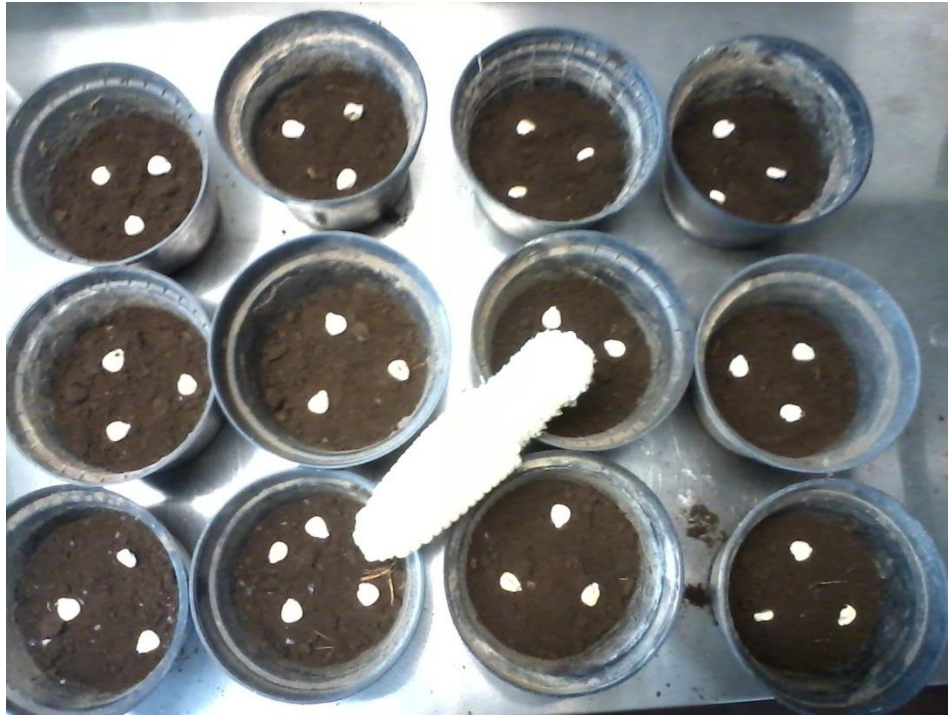


Figura 5. Semillas de maíz cacahuazintle.

6.4. Solución de metil paratión

Se prepararon soluciones de metil paratión a concentraciones de 50 y 100 mgL⁻¹ a partir de un estándar analítico de metil paratión (figura 6), a cada tratamiento con suelo, plántula de maíz e inóculo de *Pilobolus* sp, se le agregó un volumen de 30 mL de las soluciones de metil paratión.



Figura 6. Estándar analítico de metil paratión.

6.5. Sistemas Experimentales

Los sistemas (figura 7) se realizaron por germinación directa, se utilizaron recipientes con 200 g de suelo, 30 recipientes por lote y se realizaron 3 repeticiones. Para el método de germinación, a cada recipiente se le agregaron 50g de inóculo de *Pilobolus* sp. mezclado con excremento de bovino, a esta mezcla de suelo estéril con el inóculo se le denomina sustrato experimental. Al sustrato experimental se le agregaron 10 mL de solución de metilparatión a 2 concentraciones (30 y 50) y se dejó reposar por 24 h, posterior a ello se colocaron 3 semillas de maíz seleccionado y se dejó germinar por 15 días bajo condiciones de invernadero, 28 °C, 60 % de humedad relativa y fotoperiodo 12 h luz y 12 h oscuridad.



Figura 7. Sistemas experimentales de cultivos de maíz inoculados con *Pilobolus*.

6.6. Concentración de clorofila a, b y carotenos en plántulas de maíz

Este parámetro se evaluó en las plántulas de maíz para monitorear el efecto del metil paratión sobre los procesos fisiológicos de la planta, es decir, la eficiencia en la fotosíntesis, para ello se ajustó el método de cuantificación de clorofila a, b y carotenos de Val, *et al.* (1985), Cambrón-Sandoval, *et al.* (2011) y Tejocote-Pérez, *et al.* (2012) el cual consistió en macerar 1.5 g de hojas de maíz en una solución concentrada de acetona (15 ml) durante 20 minutos, para hacer más eficiente la extracción de los pigmentos se aplicó una agitación cerrada, posteriormente se evaluó la absorbancia de los pigmentos mediante

espectrofotometría UV-Vis a 662, 645 y 470 nm para clorofila a, b y carotenos, respectivamente. Las fórmulas aplicadas para la cuantificación de los pigmentos en $\mu\text{g/mL}$ son las siguientes:

$$\mu\text{g/mL (Clorofila a)} = 10.81 * \text{abs } 662 - 0.75 * \text{abs } 645$$

$$\mu\text{g/mL (Clorofila b)} = 19.02 * \text{abs } 645 - 3.98 * \text{abs } 662$$

$$\mu\text{g/mL (Carotenos)} = 3.775 * \text{abs } 470 - 0.21 * \text{Clorofila b}$$

6.7. Determinación de la concentración de metil paration

Para la determinación de metil paration se utilizaron 2 técnicas indirectas por espectrofotometría UV-Vis, la primera consiste en la hidrólisis alcalina de MP adicionando hidróxido de sodio 1M. a una muestra que contiene metil paration, se deja reposar durante 3 minutos y posteriormente se lee la absorbancia a 409 nm. La segunda se basa en la reacción de Ellman que consiste en que la pseudocolinesterasa presente en el suero de la sangre cataliza la hidrólisis de la acetilcolina, formando tiocolina y ácido acético. La tiocolina liberada reacciona con el ácido produciendo un compuesto de color amarillo a temperatura ambiente, que absorbe a 409 nm. La velocidad de aparición del color amarillo es proporcional a la actividad enzimática. Se extrajo sangre de ratas macho Wistar de 60 días de edad del bioterio del CIRB, por punción cardiaca con heparina como anticoagulante, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se separó el suero, el cual se incubó con un extracto de suelo contaminado con MP (inhibidor de la pseudocolinesterasa), por lo tanto no se genera tiocolina y como consecuencia no hay

formación de complejo amarillo. La cantidad de luz absorbida a 409 nm es inversamente proporcional a la concentración del plaguicida. Se realizó una curva estándar en un intervalo de concentraciones de 10 a 30 mg.L⁻¹ de MP

Método de extracción del MP del suelo. En matraces erlenmeyer se colocaron 20 g de suelo contaminado con metil paratión, a cada uno se le agregaron 50 ml de acetona; se agitó con ayuda de un agitador durante 10 min, al final de este tiempo se filtró el suelo a través de un papel filtro, se colectó el filtrado en un vaso de precipitado y se colocó en un baño maría y se evaporó el solvente a una temperatura entre 35 y 40°C, hasta sequedad. El residuo obtenido en el vaso de precipitado se resuspendió con 2.5 ml de agua desionizada.

Determinación del MP por el método de Ellman

Se tomaron 50 µl del extracto de suelo y se colocaron en un tubo de ensayo para hacer la reacción de Ellman, incubando con 40 µl de suero de ratón durante 10 minutos a temperatura ambiente (± 25 °C). La reacción se leyó en un espectrofotómetro a 409 nm.

6.8. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó estadística descriptiva e inferencial, se aplicaron pruebas estadísticas como ANOVAs y pruebas de diferencia mínima significativa (LSD), con un nivel de confianza del 95%; se procesaron en el software Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

Los resultados se presentan en dos apartados, en el primero se incluyen los resultados por publicar enviados a la revista Fungal Biology (ver apartado a) y en el segundo apartado se presentan los resultados por publicar con relación a la modificación del fotoperiodo del hongo *Pilobolus* sp. para su cultivo en invernadero (ver apartado b).

a) Artículo científico titulado **“Biological translocation of parathion methyl by *Pilobolus* sp in corn microsystems”** enviado a la revista Fungal Biology.

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Contact us Help ?

'My EES Hub' available for consolidated users ... more

Username: moytej

Switch To: Author

Version: EES 2015.8

Submissions Being Processed for Author MOISES TEJOCOTE-PEREZ

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	FUNBIO-D-15-00277	Biological translocation of parathion methyl by <i>Pilobolus</i> sp in corn microsystems	14 Aug 2015	17 Aug 2015	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

El Domingo, 16 de agosto, 2015 20:28:30, Fungal Biology
<ees.funbio.0.33515b.b39c6ee8@eesmail.elsevier.com> escribió:

Fungal Biology

Ref: FUNBIO-D-15-00277

Title: Biological translocation of parathion methyl by *Pilobolus* sp in corn microsystems

Authors: Luis Antonio Vaje-Romero; MOISES TEJOCOTE-PEREZ; Patricia Balderas-Hernández, Dr; Gabriela Roa-Morales, Dr; Carlos Eduardo Barrera-Díaz, Dr; Aracely Amaya-Chávez, Dr; Arturo Venebra-Muñoz, Dr

Article Type: Original Research

Dear Mr MOISES TEJOCOTE-PEREZ,

Your submission entitled "Biological translocation of parathion methyl by *Pilobolus* sp in corn microsystems" has been assigned the following manuscript number: FUNBIO-D-15-00277.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/funbio/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Fungal Biology

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com

Biological translocation of parathion methyl by *Pilobolus* sp in corn microsystems

Vaje-Romero L.A.¹, Tejocote-Pérez M.^{2*}, Balderas-Hernández P.¹, Roa-Morales G.¹, Barrera-Díaz, C.E.¹, Amaya-Chávez A.³, Venebra-Muñoz, A.².

¹ Laboratorio de Química Ambiental. Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, UAEM-UNAM.

² Laboratorio de Micología. Centro de Investigación en Recurso Bióticos. Universidad Autónoma del Estado de México.

³ Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México.

Keywords

Pilobolus, parathion methyl, corn, translocation

Abstract

Methyl parathion is a widely used organophosphorous pesticide that causes severe health and environmental effects. We investigated *Pilobolus* ability to remove methyl parathion in microhabitats corn crop was evaluated, this study is the first report of *Pilobolus* in the presence of pesticides. The research was conducted at laboratory level but considering that the conditions were adhered as possible to a real system of corn, microhabitats were obtained by direct germination of corn variety cacahuazintle placed in agricultural soil amended with manure and inoculated with *Pilobolus* sp. Spores. Additional testing was performed without *Pilobolus* inoculum, both treatments were exposed to 50 and 100 mgL⁻¹ of methyl parathion, it was found that the fungus eliminates methyl parathion in microhabitat and also influences positively by 20% in physiological processes of corn plants. It was determined that the fungus is tolerant to 100 mgL⁻¹ and this concentration is low able to grow. This research into the field of mycoremediation widens the use of little-studied fungal species to remove pesticides, as is the case of *Pilobolus*.

*Corresponding author: Tejocote-Pérez, M. e-mail: mtp@uaemex.mx

1. Introduction

Due to the widespread use of organophosphorous pesticides, serious environmental problems are emerging in recent years. Parathion methyl (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phos-phorothioate), one kind of organophosphorous, is a widely used insecticide in agricultural production, which has highly toxicity to living beings. Parathion methyl can primarily over-stimulate the nervous system, resulting in nausea, dizziness, respiratory paralysis and death. Since parathion methyl is known to have serious adverse impact to non-target organisms, there is a serious concern about the toxicological and environmental risks associated with parathion methyl residues (Xiaodong *et al* 2014).

Organophosphate pesticides are the most hazardous insecticides which are widely used as persistent pesticides and nerve agents. Their significantly high toxicity could result in severe health problems on the visual system, sensory function, cognitive function in both animals and humans (Xu-Cheng *et al.* 2015).

Parathion methyl is an important organophosphate pesticide has been applied worldwide to municipal hygiene, disease vector control and agricultural and household pest's control. His toxicity affects the central nervous system, through the non-reversible phosphorylation of esterases, mainly acetylcholinesterase, responsible for the hydrolysis of acetylcholine neurotransmitter (Ghanem & Raushel, 2005; Zheng *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008).

Parathion methyl was introduced in the market in the early 1950s and was extensively used as an agricultural insecticide due to its high efficiency, low bioaccumulation and relatively short half-life in the environment (Diagne *et al.*, 2007, Mulchandani *et al.*, 2006).

Because of its high toxicity, methyl parathion has been classified as an “extremely hazardous” insecticide by the World Health Organization and its use has been restricted by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (Edwards & Tchounwou, 2005; Diagne *et al.*, 2007).

In biological systems, methyl parathion is easily activated to the methyl paraoxon form, which is extremely more potent in inactivating esterases enzymes (Edwards & Tchounwou, 2005).

Many methods for Ops detection have been reported, including the Association of Official Analytical Chemists methods, and enzyme-linked immunosorbent assays. These assays require expensive instrumentation, complex sample preparation or purification procedures, and costly bio-molecular reagents. As an alternative to the expensive instrumental and laborious anti-body methods, fluorescence measurements have been successfully developed as a qualitative and quantitative screening tool for Ops detection. Quantum dots (QDs) owing to the quantum-size confinement effects, have unique spectral and electronic properties such as narrow emission spectra, water solubility and high light stability, resulting in being widely used for biological detection (Yan, *et al.* 2015).

The indiscriminate use of pesticides has led to public concern about their disposal and accumulation in the environment, as well as the exposure of non-target organisms, which may be affected by their toxicity. The best known treatments include the removal of the contaminated material and disposal in landfills, in situ incineration or in situ biological remediation (Sutherland *et al.*, 2004).

Pesticides can be degraded by microbial, chemical and photodegradation processes in the environment. Nonetheless, microbial degradation is considered the major determining factor of the organophosphate pesticide fate in the environment and is often the main process of pesticide degradation in soils, representing the safest, least disruptive and most cost-effective treatment method (Sutherland *et al.*, 2004; Gavrilesco, 2005)

The biodegradation of parathion methyl by bacteria has been described in some papers (Qiu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Pino & Peñuela, 2011; Ali *et al.*, 2012) however; biodegradation of methyl parathion by fungi is still underexplored in comparison with bacteria studies.

Fungal biomass is a promising source for degradation of methyl parathion, utilized degrading enzymes, show unique properties, high tolerance and adaptability (Ghosh *et al.*, 2005).

There are very few references in the literature dealing with the cultivation in pure culture of species of *Pilobolus*. In these reported cases of pure culture, a dung decoction has always been a necessary constituent of the media used for growth. This fact seemed rather

remarkable considering the extensive literature on the morphology, light relationships, spore discharge and others, of this genus (Foos and Sheehan, 2011).

2. Materials and methods

2.1 Reagents

Analytical standard of methyl parathion was purchased from Sigma Aldrich. From this reactive, two solutions were prepared, the first having a concentration of 50 mgL⁻¹ and the second at a concentration of 100 mgL⁻¹, which they were used in corn microsystems.

2.2 Growth of *Pilobolus* fungi to the experimental systems

The figure 1 shown the growth of the fungus *Pilobolus* was obtained from bull dung, stool specimens were collected in the municipality of Zinacantepec, State of México considering that these were fresh, they were placed in sealed containers for transportation to the laboratory where 1 kg of excrement was placed in boxes (3) 35 x 20 cm with red cellophane on top as infrared wavelengths increase fungus proliferation, cultivation remained at a 60% relative humidity and under these conditions the fungus began to bear fruiting structures after 5-6 days, after which the fungus was characterized by optical microscopy and stereoscopic (MEIJI ML5100) to know its morphology. Sporangia were collected and placed in a solution at 10% nitric acid to release the spores, with this solution the corn microsystems was inoculated.

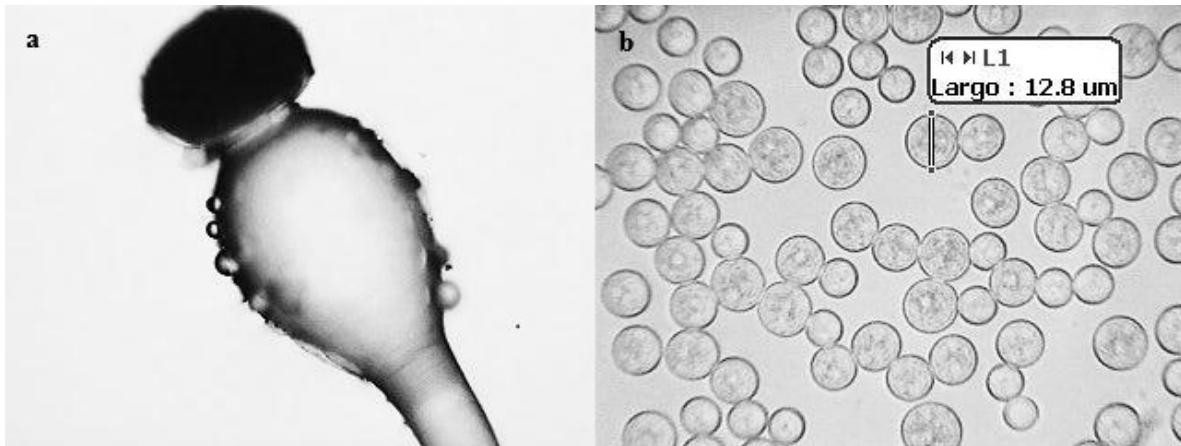


Figure 1. Growth of *Pilobolus* fungi and corn microsystems to the experimental systems, a) *Pilobolus* vesicle sporangial and b) Spores.

2.3 Corn microsystems

Soil samples were taken directly from the topsoil of an agricultural area in the municipality of Zinacantepec, which were handled as the samples of manure, however, additional soil samples were sterilized in an autoclave at 20 lb pressure and at 120 ° C for 30 minutes. Soil was then placed in containers (30), 300 g of soil were placed in each pot and each 3 seeds of corn cacahuazintle variety for direct germination seedlings were planted; corn seeds were collected from the soil area and cacahuazintle variety was chosen because it has a higher rate of growth compared with other varieties of corn. Corn microsystems were subsequently watered with 40 mL of parathion methyl solution and inoculated with spores of *Pilobolus*.

2.4 Determination of Methyl Parathion

For determination of methyl parathion 2 technical indirect UV-Vis spectrophotometry were used, the first is the alkaline hydrolysis of MP adding 1M sodium hydroxide. A sample containing methyl parathion, allowed to stand for 3 minutes and then the absorbance is read at 409 nm. The second is based on the reaction of Ellman consisting pseudocholinesterase present in the blood serum catalyzes the hydrolysis of acetylcholine, forming thiocholine and acetic acid. The thiocholine liberated reacts with the acid affording a yellow compound at room temperature, which absorbs at 409 nm. The rate of appearance of the yellow color is proportional to enzyme activity. Blood of male Wistar rats 60 days old bioterio the BRIC extracted by cardiac puncture with heparin as anticoagulant, then centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the serum, which is incubated with a sample of contaminated soil removed MP (inhibitor pseudocholinesterase) therefore not thiocholine is generated and consequently no formation of yellow complex. The amount of light absorbed at 409 nm is inversely proportional to pesticide concentration. A standard curve was performed in a concentration range of 10 to 30 mg L⁻¹ MP

Extraction method MP soil. Erlenmeyer flasks in 20 g of soil contaminated with methyl parathion, each were added 50 mL of acetone were placed; was stirred with a stirrer for 10 min, at the end of this time the ground was filtered through a filter paper, the filtrate was collected in a beaker and placed in a water bath and the solvent evaporated to a temperature between 35 and 40 ° C, to dryness. The residue obtained in the beaker was resuspended with 2.5 ml of deionized water.

MP determination by the method of Ellman

50 μL of soil extract were taken and placed in a test tube to the Ellman reaction, incubating with 40 μL of mouse serum for 10 minutes at room temperature ($\pm 25^\circ\text{C}$). The reaction was read in a spectrophotometer at 409 nm; the calibration curve show a value $R^2 = 0.9709$ and the equation $A = 0.007[\text{MP}] + 0.011$

Initially spectrophotometric characterization of the hydrolysis of methyl parathion to p-nitrophenol was performed. A 30 mgL^{-1} solution of methyl parathion was prepared (technical grade) in 1M NaOH and at 409 nm as the maximum absorbance was obtained by performing a 900-200 nm scanning in order to appreciate the formation of the absorption band of the p-nitrophenol.

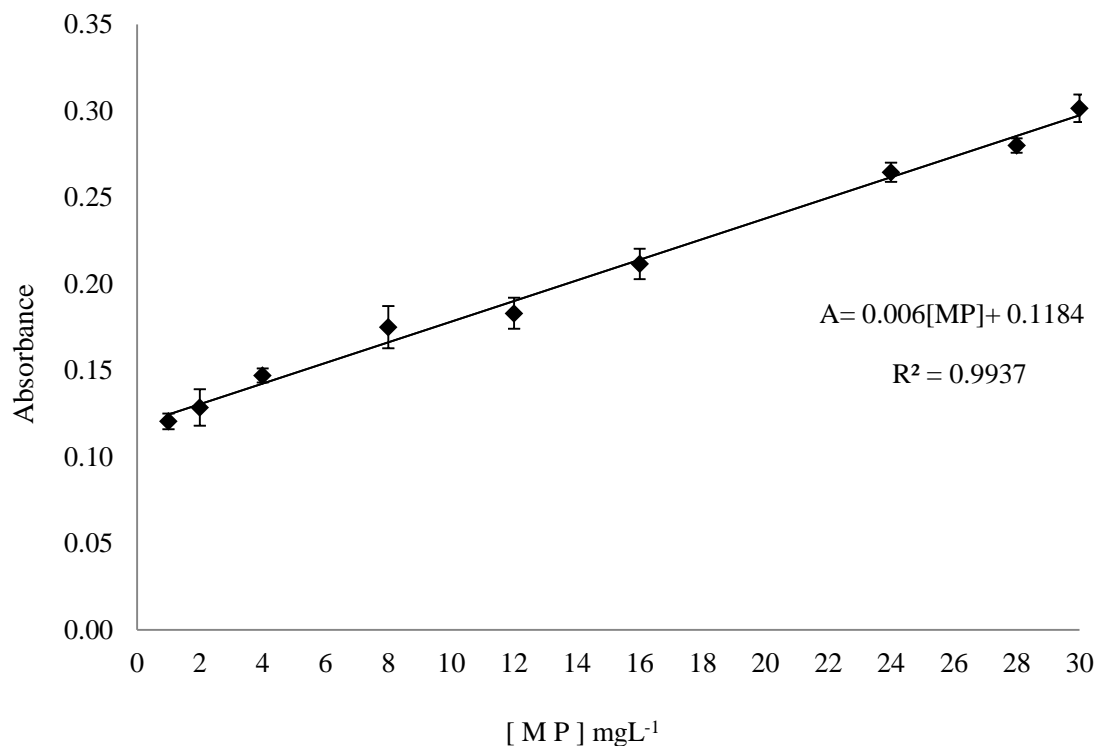


Figure 2. Calibration curve to methyl parathion reactive grade.

2.5 Quantification of chlorophyll a, b and carotenes in corn plants

This parameter is evaluated in corn plants to monitor the qualitative effect of parathion methyl on the physiological processes of the plant, the efficiency of photosynthesis, for which the method adjusted quantifying chlorophyll a, b and carotenes of Val, *et al.* (1985), Cambron-Sandoval, *et al.* (2011) and Tejocote-Pérez, *et al.* (2010:2012) was used, which consisted of 1.5 g of macerated leaves of corn in a concentrated solution of acetone (15 ml) for 20 minutes, to make more efficient extraction of the pigments a closed agitation was applied, then the pigments absorbance was evaluated by UV-Vis spectrophotometry at 662, 645 and 470 nm for chlorophyll a, b and carotenes, respectively. The formulas used for quantification of the pigments in $\mu\text{g/mL}$ are: $\mu\text{g/mL}$ (Chlorophyll a) = $10.81 * \text{abs } 662 - 0.75 * \text{abs } 645$, $\mu\text{g/mL}$ (Chlorophyll b) = $19.02 * \text{abs } 645 - 3.98 * \text{abs } 662$, $\mu\text{g/mL}$ (Carotenes) = $3.775 * \text{abs } 470 - 0.21 * \text{Chlorophyll b}$.

3. Results and Discussions

3.1 Parathion methyl in soil

Figure 2 shows the UV-Vis spectroscopy characterizations of parathion methyl in soil corn systems. In this figure the parathion methyl concentration decreased at 409 nm of wavelength in soil samples.

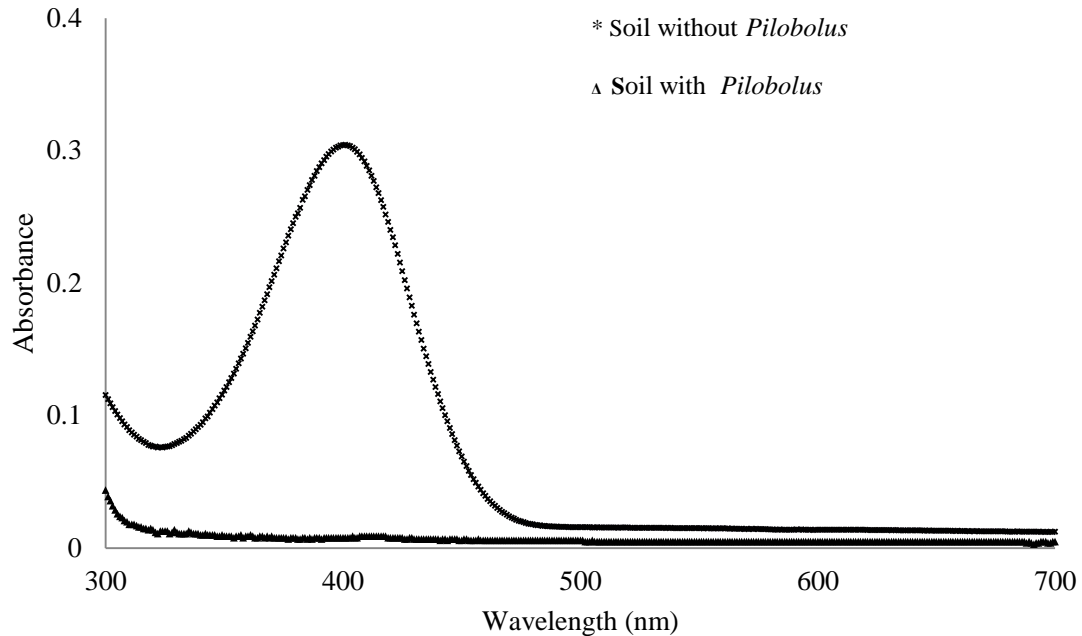


Figure 3. UV-Vis spectroscopy characterizations of parathion methyl in soil corn systems

In Figure 3, a significant difference was observed in the concentration of methyl parathion from soil samples without and with *Pilobolus*, the maximum absorption band at 409 nm is characteristic of p-nitrophenol, and this is proportional to the concentration of methyl parathion. The first line has a higher absorbance corresponding to the concentration of methyl parathion in soil after corn plants were removed, in this experiment *Pilobolus* not applied and methyl parathion noted that despite having a half-life short in the environment, you can also stay persistent. The second line has a lower absorbance corresponding to the concentration of methyl parathion in soil after removing corn plants, in this case if applied *Pilobolus* is observed and a decrease in the concentration of methyl parathion in the presence of the fungus, because no analytical response is observed.

3.2 Parathion methyl in *Pilobolus*

The figure 4 shows the UV-Vis spectroscopy characterizations of parathion methyl in *Pilobolus*. In this figure there is no presence of methyl parathion in *Pilobolus* samples.

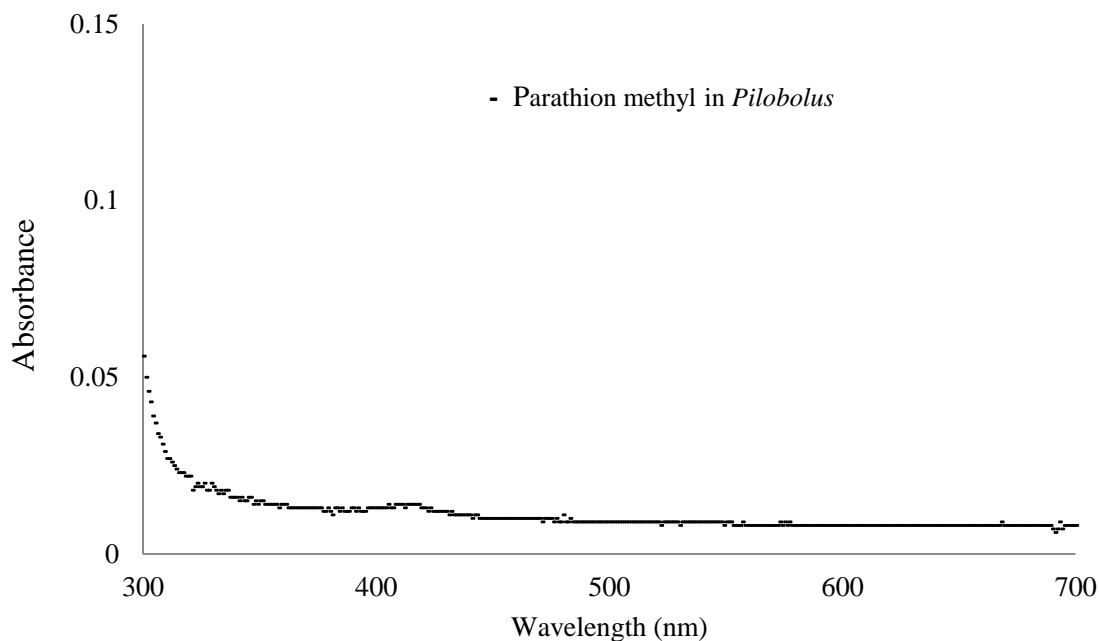


Figure 4. UV-Vis spectroscopy characterization of parathion methyl in *Pilobolus*

Figure 4 shows that there is no presence of methyl parathion or p-nitrophenol *Pilobolus* biomass in the presence of pesticide on the sporangial vesicle and hyphae was analyzed. Based on that report Alvarenga *et al.* 2014 some fungi such as *Aspergillus* and *Penicillium* have the ability to degrade methyl parathion to p-nitrophenol in this sense can say that *Pilobolus* is also capable of degrading methyl parathion molecule and this allows a better physiological functioning of corn plants as it is shown in section 3.5.

3.4 Parathion methyl in corn plants

The figure 5 shows the UV-Vis spectroscopy characterizations of parathion methyl in corn plants. In this figure there is no presence of methyl parathion in corn plants samples because no analytical response is observed.

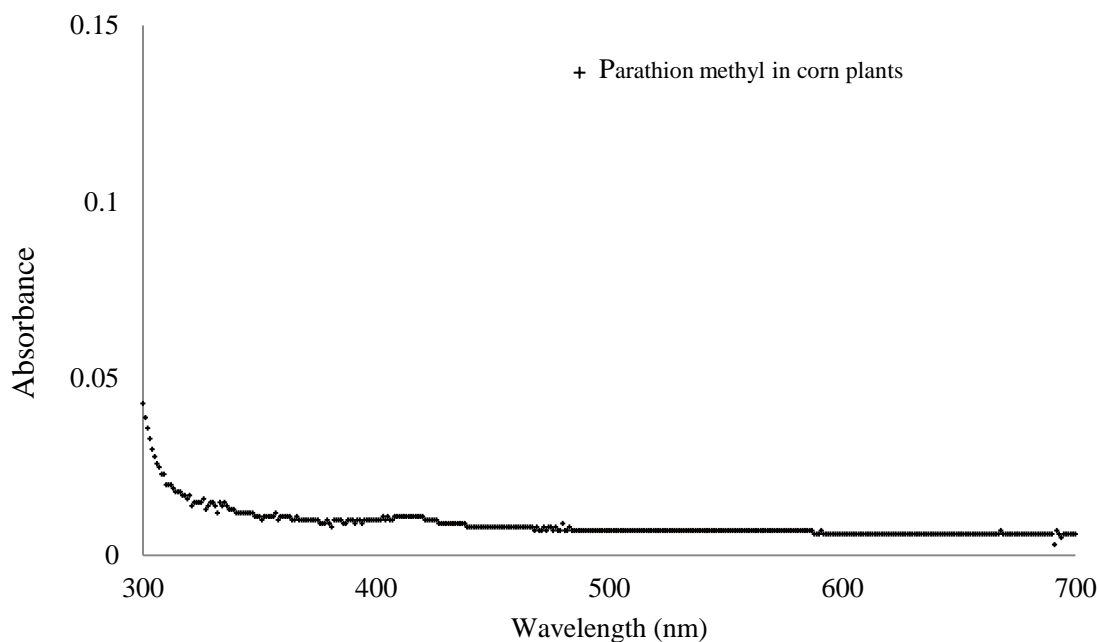


Figure 5. UV-Vis spectroscopy characterization of parathion methyl in corn plants.

Figure 5 shows that there is no presence of methyl parathion or p-nitrophenol in the biomass of corn plants, the presence of the pesticide in the root, stem and leaves were analyzed. Based on that report Vazquez-Alarcon *et al.* 2004 corn plants can accumulate pollutants such as heavy metals and pesticides in their tissues we can conclude that the presence of *Pilobolus* has a positive impact on the physiology of plants corn and degrading parathion methyl and therefore does not allow accumulation in plants.

3.5 Treatment plants with *Pilobolus*

The figure 6 shows differences in the concentration of chlorophyll a, b and carotenes from corn plants exposed to parathion methyl as well as unexposed plants. Corn plants exposed to methyl parathion have a 9 % lower concentration of chlorophyll a, b carotene with respect to other plants. In these cases, *Pilobolus* inoculum was applied.

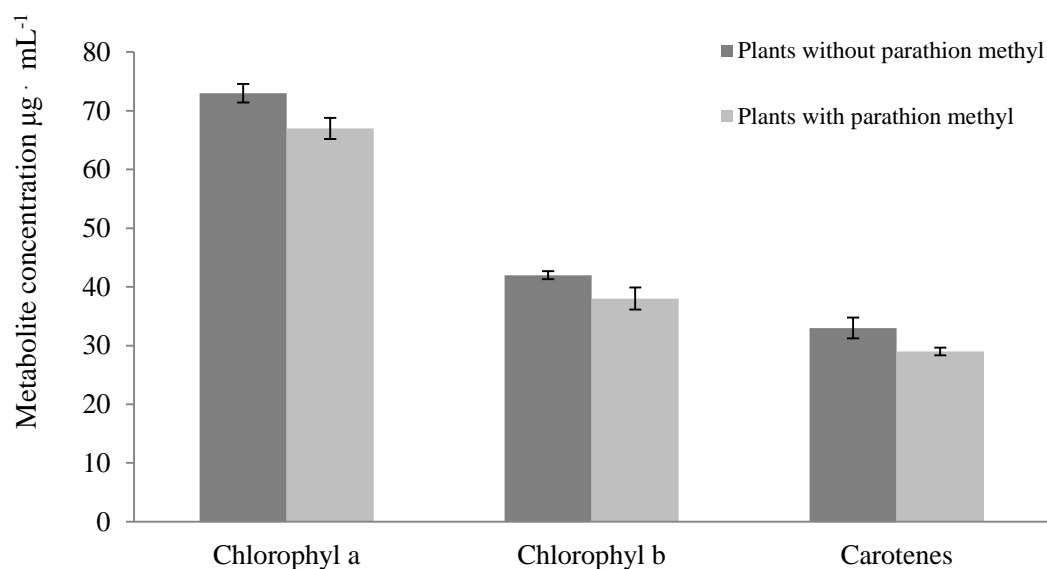


Figure 6. Concentration of chlorophyll a, b and carotenes in corn plants with *Pilobolus*.

Figure 6 shows the concentration of chlorophyll a, b and carotens in plants exposed corn is seen and not exposed to methyl parathion, in both treatments biomass *Pilobolus* was applied, plants that were not exposed to methyl parathion have 9% higher concentration chlorophyll a, b and carotenes that exposed plants, however this concentration difference is not statistically significant (ANOVA, $p > 0.05$) suggesting that the presence of *Pilobolus* has a positive impact on the physiology of corn plants exposed to methyl parathion 20%.

3.6 Treatment plants without *Pilobolus*

Figure 7 shows differences in the concentration of chlorophyll a, b and carotenes from corn plants exposed to parathion methyl and unexposed plants. Corn plants exposed to parathion methyl have a 30% lower concentration of chlorophyll a, b carotene with respect to other plants. In these cases, inoculum of *Pilobolus* was not applied.

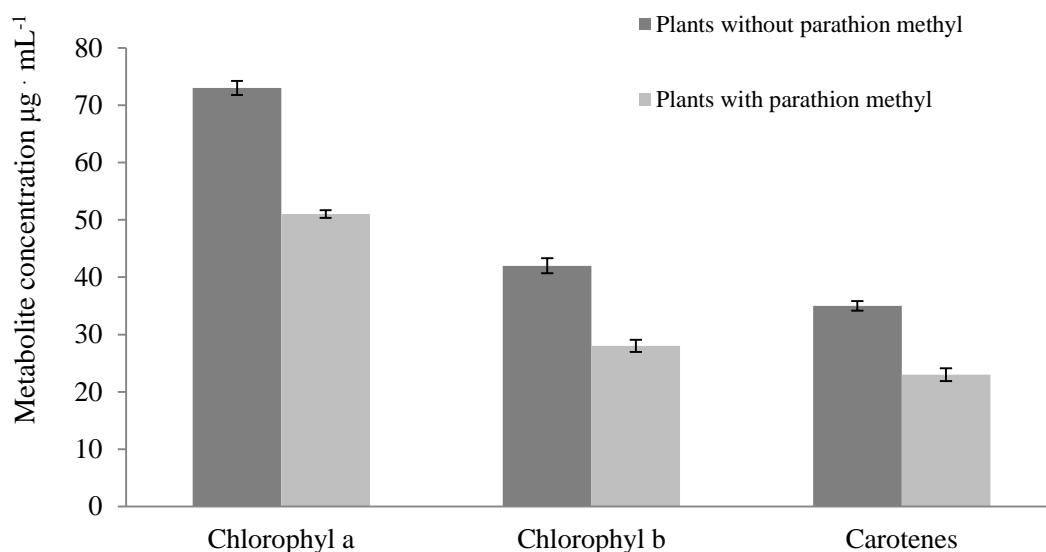


Figure 7. Concentration of chlorophyll a, b and carotenes in corn plants without *Pilobolus*.

A previous experiment using plants exposed and unexposed corn but without using fungal biomass, in the figure 7, the concentration of chlorophyll, carotenoids in plants by corn exposed and not exposed to methyl parathion was performed observed; the plants were exposed to methyl parathion have 30% lower concentration of chlorophyll a, b and carotenes unexposed plants, the concentration difference is statistically significant

(ANOVA, $p < 0.05$) suggesting that the presence of methyl parathion in microsystems corn negatively influences in the physiology of corn plants. The factor of translocation is 0.036.

3.7 Corn plants biomass

The figure 8 shows differences in the weight of exposed and unexposed corn plants to parathion methyl, in these cases inoculum of *Pilobolus* was not applied. Corn plants exposed to methyl parathion have a lower weight with respect to other plants. The figure 9 shows the differences in the length from exposed and unexposed corn plants to parathion methyl, in these cases inoculum of *Pilobolus* was applied. Corn plants exposed to methyl parathion have a lower length with respect to other plants.

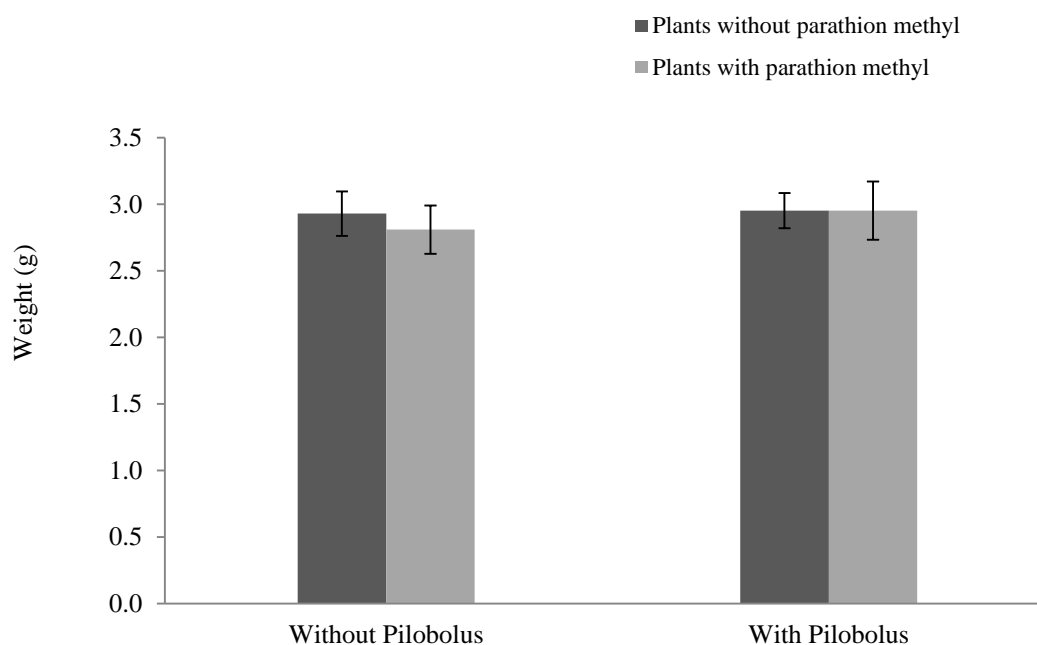


Figure 8. Weight of corn plants in the treatment.

It was determined if the weight of the plants is influenced by the presence of methyl parathion performing an experiment using plants exposed corn and unexposed but without

using fungal biomass, Figure 8 shows that the exposed plants have less weight to unexposed plants and that there are significant differences in the weight of the exposed and not exposed to the pesticide plant (ANOVA, $p < 0.05$), which is directly related to the concentration of chlorophyll a, b and carotenoids. Subsequently repeat the experiment using fungal biomass and determined that the weight of the exposed and unexposed to methyl parathion plants does not differ significantly from each other, which is related to the concentration of chlorophylls because in this case also the fungus it has a positive influence on plants.

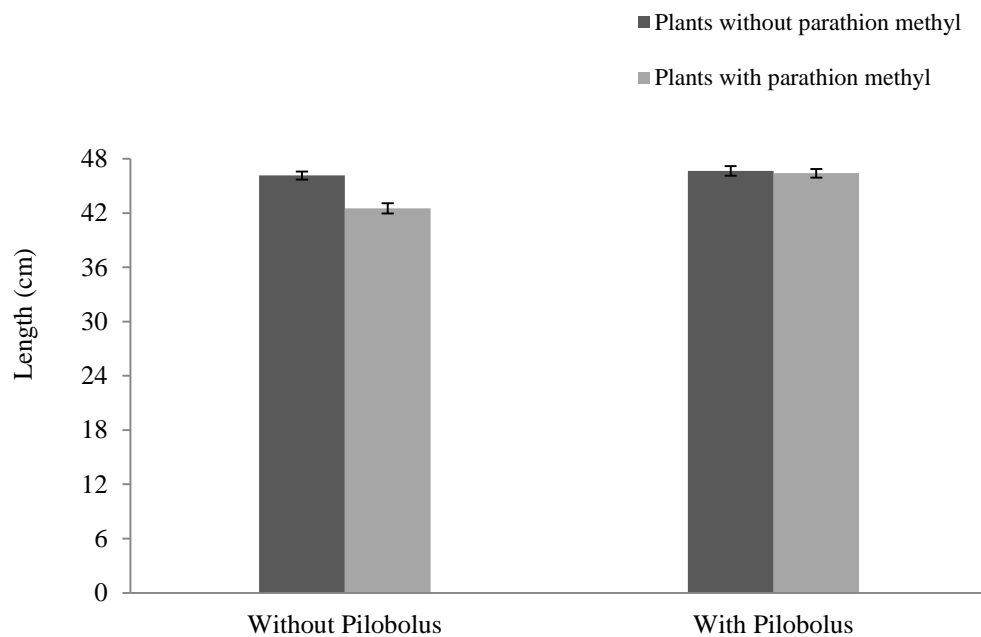


Figure 9. Length of corn plants in the treatment.

We determined whether the length of the plants is influenced by the presence of methyl parathion performing an experiment using plants exposed corn and unexposed but without using fungal biomass, in the figure 9, it shows that the exposed plants have less length to unexposed plants and that there are significant differences in the weight of the exposed and not exposed to the pesticide plant (ANOVA, $p < 0.05$), which is directly related to the

concentration of chlorophyll a, b and carotenoids. Subsequently repeat the experiment using fungal biomass and determined that the length of the exposed and unexposed to methyl parathion plants not significantly differ from each other, which is related to the concentration of chlorophylls because in this case also the fungus It has a positive influence on plants.

Corn plants exposed to methyl parathion showed a significant decrease in concentration of chlorophyll a, b carotenes with respect to not exposed plants to the pesticide (Figure 7) also in soil samples of plants exposed to methyl parathion. It was determined that this pesticide remains on the soil (figure 3), in both cases of fungal biomass, *Pilobolus* was not implemented.

Then an experiment with similar conditions displayed above was conducted, fungal biomass *Pilobolus* was also added, after this experimental treatment it was determined that there are no significant differences in the concentration of chlorophylls a, b and carotenes from exposed and unexposed corn plants to methyl parathion (figure 6) and the presence of methyl parathion and p-nitrophenol was tracked in the fungus (figure 4), soil (figure 3) and corn plants (figure 5), it was known that, after applying *Pilobolus* biomass, there was no presence of methyl parathion, based on what Alvarenga *et al.* (2014) report, that fungi as *Penicillium* and *Aspergillus* can degrade methyl parathion to p-nitrophenol which means that *Pilobolus* can degrade methyl parathion.

In the case of biomass corn plants, it was also determined that weight and length of corn plants exposed to methyl parathion decreased significantly compared to weight and length of not exposed plants to the pesticide.

5. Conclusions

Pilobolus efficiency to remove methyl parathion microhabitats corn is major at 90% and does not allow to accumulate this pesticide in corn plants or in soil, further the fungus has a positive influence on physiological plant efficiency by 20% because chlorophyll concentration a, b and carotenes increases considerably in corn plants in the presence of the fungus. *Pilobolus* is a fungal tolerant to concentrations of 50 and 100 mgL⁻¹ of methyl parathion, which means it is a fungus tolerant to high concentrations of pesticide, further is a fungus that develops easily in manure of cattle and for this reason used to be applied in situ. This research contributes specifically to the area of knowledge of the mycoremediation, because it is the first evidence is recorded on the removal of pesticides coprophilous micromycetes belonging to this taxon.

6. Acknowledgments

This research was made by the support give to the CONACYT and the Facultad de Química of the Universidad Autónoma del Estado de México.

7. References

1. Ali, M., Naqvi, T.A., Kanwal, M., Rasheed, F., Hameed, A., Ahmed, S., 2012. Detection of the organophosphate degrading gene *opdA* in the newly isolated bacterial strain *Bacillus pumilus* W1. *Ann. Microbiol.* 62, 233–239.
2. Almeida D. V., Vaz B., Figueiredo M. A., Varela J. A. S., Marins L. F. 2014. Fluorescent transgenic zebrafish as a biosensor for growth-related effects of methyl parathion. *Aquatic Toxicology.* 152, 147–151.
3. Alvarenga N., Birolli W. G., Selegim M. H. R., Porto A. L. M. 2014. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere.* 117, 47–52.
4. Diagne, M., Oturan, N., Oturan, M.A., 2007. Removal of methyl parathion from water by electrochemically generated Fenton's reagent. *Chemosphere* 66, 841–848.
5. Edwards, F.L., Tchounwou, P.B., 2005. Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure a scientific review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2, 430–441.
6. Foos (a) K. M. 1997. Pilobolus and lungworm disease affecting elk in Yellowstone National Park. *Mycology Research.* 101, 1535–1536.
7. Foos (b) K. M. and Sheehan K. B. 2011. Molecular identification of *Pilobolus* species from Yellowstone National Park. *Mycologia,* 103, 1208–1215.
8. Gavrilescu, M., 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* 5, 497–526.
9. Ghanem, E., Raushel, F.M., 2005. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 459–470.

10. Ghosh, D., Saha, M., Sana, B., Mukherjee, J., 2005. Marine enzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 96, 189–218.
11. Halaimi F.Z., Kellali Y., Couderchet M., Semsari S. 2014. Comparison of biosorption and phytoremediation of cadmium and methyl parathion, a case-study with live *Lemna gibba* and *Lemna gibba* powder. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 105 , 112–120.
12. Henycha J., Stengl V., Slusná M., Grygar T. M., Janos P., Kurán P., Stastny M. 2015. Degradation of organophosphorous pesticide parathion methyl on nanostructured titania-iron mixed oxides. *Applied Surface Science.* 344, 9–16.
13. Huang X. and Huang H-Q. 2012. Alteration of the kidney membrane proteome of *Mizuhopecten yessoensis* induced by low-level methyl parathion exposure. *Aquatic Toxicology* 114– 115, 189– 199.
14. Lange L. E., Kay O. S. 2015. Degradation studies of methyl parathion with CuBTC metal-organic framework. *Journal of Environmental Chemical Engineering.* 3, 541–547.
15. Liu, F.-Y., Hong, M.-Z., Liu, D.-M., Li, Y.-W., Shou, P.-S., Yan, H., Shi, G.-Q., 2007. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *J. Environ. Sci.* 19, 1257–1260.
16. Mulchandani, P., Chen, W., Mulchandani, A., 2006. Microbial biosensor for direct determination of nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents using genetically engineered *Moraxella* sp. *Anal. Chim. Acta* 568, 217–221.
17. Nair R., Singh V., Salian S. R., Kalthur S. G., D'Souza A. S., Shetty P. K., Mutalik S., Kalthur G. and Adiga S. K. Methyl parathion inhibits the nuclear maturation, decreases

- the cytoplasmic quality in oocytes and alters the developmental potential of embryos of Swiss albino mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 279, 338–350.
18. parathion mineralizing activity. *J. Appl. Microbiol.* 101, 986–994.
 19. Pino, N., Peñuela, G., 2011. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 827–831.
 20. Qiu, X.H., Bai, W.Q., Zhong, Q.Z., Li, M., He, F.Q., Li, B.T., 2006. Isolation and characterization of a bacterial strain of the genus *Ochrobactrum* with methyl
 21. Sutherland, T., Horne, I., Weir, K., Coppin, C., Williams, M., Selleck, M., Russell, R., Oakeshott, J., 2004. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 817–821.
 22. Tee-Kheang N., Gahan L. R., Schenk G., Ollis D. L. 2015. Altering the substrate specificity of methyl parathion hydrolase with directed evolution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 573, 59–68.
 23. Tejocote-Pérez, M., Balderas-Hernández, P. Barrera-Díaz, C., Roa-Morales, G. and Natividad-Rangel, R. 2010. Treatment of industrial effluents by a continuous system: electrocoagulation-activated sludges. *Bioresource Technology*. 101. 7761-7766.
 24. Tejocote-Pérez, M., Balderas-Hernández, P. Barrera-Díaz. 2012. Ectomicorrización de suelo agrícola forestal: Bioensayos con *Pinus patula* y *Amanita muscaria* con suelo del Parque Nevado de Toluca, Estado de México. Ed EAE, España. 56-80 pp.
 25. Wang L., Chi X., Zhang J., Sun D., Zhou N. 2014. Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 87, 116-121.

26. Wang X., Yang Y., Dong J., Bei F., Ai S. 2014. Lanthanum-functionalized gold nanoparticles for coordination–bonding recognition and colorimetric detection of methyl parathion with high sensitivity. *Sensors and Actuators. B* 204, 119–124.
27. Xu S., Guo C., Li Y., Yu Z., Wei C., Tang Y. 2014. Methyl parathion imprinted polymer nanoshell coated on the magnetic nanocore for selective recognition and fast adsorption and separation in soils. *Journal of Hazardous Materials*. 264, 34– 41.
28. Xue X., Wei Q., Wu D., Li H., Zhang Y., Feng R., Du B. 2014. Determination of methyl parathion by a molecularly imprinted sensor based on nitrogen doped graphene sheets. *Electrochimica Acta*. 116, 366– 371.
29. Yan X., Li H., Yan Y., Su X. 2015. Selective detection of parathion-methyl based on near-infrared CuInS₂ quantum dots. *Food Chemistry*. 173, 179–184.
30. Yang, C., Cai, N., Dong, M., Jiang, H., Li, J., Qiao, C., Mulchandani, A., Chen, W., 2008. Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. *Biotechnol. Bioeng.* 99, 30–37.
31. Yuan Z., Yao J., Liu H. Han J., Trebše P. 2014. Photodegradation of organophosphorus pesticides in honey medium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 108, 84–88.
32. Zhao G., Huang Q., Rong X., Cai P., Liang W., Dai K. 2014. Biodegradation of methyl parathion in the presence of goethite: The effect of *Pseudomonas* sp. Z1 adhesion. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 86, 294 – 299.
33. Zheng, Y., Lan, W., Qiao, C., Mulchandani, A., Chen, W., 2007. Decontamination of vegetables sprayed with organophosphate pesticides by organophosphorus hydrolase and carboxylesterase (B1). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136, 233–241.

b) Modificación del fotoperiodo de *Pilobolus* sp.

Durante la investigación realizada invirtió el fotoperiodo (12 horas luz y 12 de oscuridad) para que se llevara a cabo el desarrollo de *Pilobolus* en el laboratorio (Figura 7), de una cepa inicial se colectaron los esporangios y se colocaron en una solución acida para simular el paso de las esporas por el tracto digestivo de los rumiantes y con esta solución posteriormente se inocularon los sistemas experimentales de maíz; esta aportación contribuye en la descripción del ciclo de vida del hongo ya que presenta un buen desarrollo de biomasa. Posteriormente se publicaran los resultados correspondientes a la modificación del ciclo de vida del hongo.



Figura 7. Invernadero utilizado para la inversión del fotoperiodo para *Pilobolus* sp.

DISCUSIÓN GENERAL

8. DISCUSIÓN GENERAL

La finalidad de esta investigación fue evaluar la capacidad del hongo *Pilobolus* para eliminar metil paratión en microcultivos de plantas de maíz expuestos a dicho compuesto, inicialmente se determinó que el metil paratión afecta los procesos fisiológicos de la plantas de maíz, se cuantifico concentración de la clorofila a, b y carotenos en plantas no expuestas al insecticida y plantas expuestas, y se determinó que las plantas expuestas al plaguicida presentan una menor cantidad de metabolitos; partiendo de este punto se aplicó el hongo a los siguientes cultivos de maíz.

Se realizó un experimento con condiciones similares mostradas anteriormente, en este caso se añadió biomasa fúngica de *Pilobolus*, después de este tratamiento experimental se determinó que no hay diferencias significativas en la concentración de clorofilas a, b y carotenos de las plantas de maíz expuestos y no expuestos al metil paratión, por lo tanto se infiere que el hongo tiene la capacidad de transformar el metil paratión.

Posteriormente se evaluó la presencia de metil paratión y p-nitrofenol en la vesícula esporangial del hongo, suelo y plantas de maíz y se observó que después de aplicar la biomasa *Pilobolus* a los microcultivos de maíz no hay presencia de metil paratión, sin embargo la finalidad de esta investigación no fue determinar la ruta de degradación del metil paratión por el hongo pero esto da la pauta para realizar otras investigaciones acerca del tema.

Otro indicador es la biomasa de plantas de maíz, porque se determinó que el peso y la longitud de las plantas de maíz expuestas al metil paratión disminuye significativamente en comparación con el peso y la longitud de las plantas no expuestas al plaguicida.

Durante la experimentación fue necesario modificar el fotoperiodo del hongo *Pilobolus* ya que las condiciones climáticas en la estacionalidad de invierno para la región del valle de Toluca no son favorables para el desarrollo del hongo, sin embargo invirtiendo el fotoperiodo (12 h de luz y 12 de oscuridad) el hongo puede desarrollarse a nivel invernadero en cualquier estación del año.

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

Se obtuvo la cepa del hongo *Pilobolus* a partir de estiércol de ganado bovino en un periodo de 4 a 5 días, modificando el fotoperiodo y acondicionando para su propagación en los sistemas experimentales de cultivos de maíz.

Una vez detallada la técnica de obtención del hongo mediante inoculación, se aplicó el hongo a los microhábitats de cultivos de maíz que se obtuvieron por germinación directa de semillas de la variedad cacahuazintle.

La eficiencia de *Pilobolus* para eliminar metil paratión de microhábitats de maíz es mayor a 90% y la presencia del hongo no permite acumulación de este insecticida en las plantas de maíz o en el suelo, además el hongo tiene una influencia positiva sobre la eficiencia fisiológica de las plantas de maíz en un 20% ya que la concentración de clorofila a, b y carotenos aumenta considerablemente en presencia del hongo.

Encontrándose que *Pilobolus* es un hongo tolerante a concentraciones de 50 y 100 mg L⁻¹ de metil paratión, lo que significa que es un hongo tolerante a altas concentraciones de este insecticida, además un hongo que se desarrolla fácilmente en el estiércol de ganado y por esta razón puede utilizarse para aplicar in situ.

Esta investigación contribuye al área de conocimiento de la micorremediación, es el primer reporte de la eliminación de metil paratión con *Pilobolus* aplicado directamente a un cultivo experimental.

REFERENCIAS

10. REFERENCIAS

- Aguilar P. N. Y., 2008. Biomasa, rendimiento y componentes de diez cultivares de maíz en la Facultad de Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Aguilar, J., y Catherine, I. C. (2003). Sistemas Agrícolas del maíz y sus procesos técnicos, Sin maíz, no hay país. México. Museo Nacional de las Culturas Populares en México.
- Arnáiz C., L. Isac y J. Lebrato. 2003. Tratamiento biológico de aguas residuales. Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Universidad de Sevilla. Sevilla.
- Atagana, H. J. 2004. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with cresolate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 851–858.
- Buitrón M. G., G. Moreno y J. A. Moreno. 2007. Tratamiento de aguas residuales industriales. Ingeniería Ambiental.
- Bumpus J. A., J. Tricter, K. Andrzejewski, H. Rhoads y M. Tatarko. 1999. Remediation of water contaminated with an azo dye: an undergraduate laboratory experiment utilizing an inexpensive photocatalytic reactor. *Chemical Education.* 76, 1680-1683.
- Ceaccon, E. (2008). La Revolución Verde tragedia en dos actos. *Ciencias*, 21-29.

- CICOPLAFEST. 1998. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias toxicas. México D.F.
- De la Vega, M. 1997. Efecto toxicológico del insecticida metil paratión sobre los organismos béticos de la presa Ignacio Ramírez. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.
- Diagne M., O. Mehmet A. y N. Oturan. 2007. Removal of Methyl Parathion from Water by Electrochemically Generated Fenton's Reagent. *Chemosphere*. 66, 5, 841-848.
- Etcharren U. P. A. 2005. Diseño de un sistema de biofiltración para la eliminación de olores en la fábrica "Lubascher y Krause" Temuco.
- García G. M. de L. 2005. Capacidad de sorción y degradación de metil paration por *Myriophyllum aguaticum* (Vell.) Verdc. en solución acuosa. Facultad de Química, UAEMex.
- García M. S., 2004. Estudio nutricional comparativo y evaluación biológica de tortillas de maíz elaboradas por diferentes métodos de procesamiento. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada.
- Garcia S.J., A.W. Abu-Qare, W.A. Meeker-O'Connell, A.J. Borton, M.B. Abou-Donia. 2003. Methyl parathion: a review of health effects. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 6, 185–210.
- Giubilei M. A., V. Leonardi, E. Federici, S. Covino, V. Sasek, C. Novotny, F. Federici, A. D'Annibale, M. Petruccioli. 2009. Effect of mobilizing agents on mycoremediation and impact on the indigenous microbiota.

- González C. U. M., J. Dávila P., J. A. Pinedo E. y B. Serrano R. 2007. Photocatalytic degradation of methyl parathion and paraquat. *Revista digital de la Universidad Autónoma de Zacatecas*. 3 (1).
- González D. 1995. Plaguicidas Organofosforados, Carbamatos y Manejo Ecológico de Plagas. CEPIS/OPS.
- González, B. P. (2006). La revolución verde en México. *AGRARIA*, Sao Paulo, 40-68.
- González, F. B. (2000). Impacto social del uso de los plaguicidas químicos en el mundo. Universidad de Matanzas.
- Herrera, T y M. Ulloa. 1998. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. UNAM - Fondo de Cultura Económica. México.
- Jaga K. y D. Chandrabhan. 2003 Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica*. 14(3), 171-85.
- Karpouzias D.G., E. Papadopoulou, I. Ipsilantis, I. Friedel, I. Petric, N. Udikovic-Kolic, S. Djuric, E. Kandeler, U. Menkissoglu-Spiroudi, F. Martin-Laurent. 2014. Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscularmycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. *Ecological Indicators*. 39, 44–53.
- Larenas U. C., D. Andrago y P. Inga. 2009. Estudio isotérmico de biosorción de plomo en aguas utilizando residuos vegetales. Centro de Investigación para la Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.

- Medaura M. C., M. Guivernau, F. Prenafeta B., X. Moreno-Ventas, M. Viñas-Canals. 2013. Micorremediación y su aplicación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados. *REDISA*. Universidad Nacional de Cuyo. Argentina.
- Murcia O. A. M. y E. Stashenko. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro sur*. 36 (2), 71-81.
- Muttray A., U. Spelmeyer, M. Degirmenci, D. Jung, G. Backer, Georg Hill. 2005. Acute effects of low doses of methyl parathion on human EEG. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 19, 477–483.
- Pitarch E. 2001. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas. Tesis Doctoral. Departament de Ciències Experimentals Química Analítica Universitat Jaume.
- Pointing, S.B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 20–33.
- Pokhrel D. y T. Viraraghavan. 2006. Arsenic removal from an aqueous solution by a modified fungal biomass. *Water research*. 40, 549 – 552.
- Ramos C. L. A. 2006. Modelación y análisis de la dispersión de plaguicidas de la zona florícola de Villa Guerrero y Tenancingo, utilizando elemento finito apoyado en un sistema de información geográfica. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UAEMéx. México.

- Rodríguez E. M., R. C. Miranda, R. Olivas y C. A. Sosa. 2008. Efecto de las condiciones de operación sobre la biosorción de Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cr^{3+} en solución por *Saccharomyces cerevisiae* residual. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Rodríguez F. A., Leton G. P., Rosal G. R., Dorado V. M., Villar F. S. y Sanz G. J. 2006. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales.
- Rubio, E. 2006. Micología General. España.
- Sánchez J. 2010. Evaluación del riesgo ecotoxicológico derivado del uso de plaguicidas organofosforados y carbámicos empleados en la zona florícola del Estado de México, basado en el uso de bioensayos y evaluaciones rápidas de los compuestos más relevantes. Tesis de Doctorado. Instituto Tecnológico de Toluca, México.
- Sánchez-Sánchez H. A. 2012. Efecto de *Salix babylonica* sobre contaminantes presentes en efluentes industriales. Tesis. Facultad de Ciencias, UAEMéx.
- Sasek V., C. Novotny, P. Vampola. 1998. Screening for efficient organopollutant fungal degraders by decolorization. *Czech Mycol.* 50, 303–311.
- Silva D., C. M. Cortez, J. Cunha-Bastos, S. R.W. Louro. 2004. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicology Letters.* 147, 53–61
- SINAVEF. (2009). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria Informe. San Luis Potosí, México.

- Tejocote-Pérez M., P. Balderas-Hernández, C.E. Barrera-Díaz, G. Roa-Morales, R. Natividad-Rangel. 2010. Treatment of industrial effluents by a continuous system: Electrocoagulation - Activated sludge. *Bioresource Technology*. 101, 7761-7766.
- Tiwari N., A. Asthana, K. Upadhyay. 2013. Kinetic-spectrophotometric determination of methyl parathion in water and vegetable samples. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 101, 54–58.
- Vázquez-Alarcon A., L. Justin-Cajuste, C. Siebe-Grabach, G. Alcántar-González y Ma. de L. de la Isla de Bauer. 2004. Cadmio, Níquel y Plomo en agua residual, suelo y cultivos en el valle del mezquital, Hidalgo, México. Colegio de Posgraduados.
- Velázquez Z. A. 2013. Determinación de áreas de cultivo florícola vulnerables a la migración de plaguicidas organofosforados y carbámicos usando un modelo de simulación de lixiviación. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UAEMéx. México.