



INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE LA
VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)

BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE LA ATRAZINA DESPUÉS DE
BIODEGRADACIÓN FÚNGICA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans***

ELIANA GABRIELA BELTRÁN VARGAS

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2023



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE LA ATRAZINA DESPUÉS DE
BIODEGRADACIÓN FÚNGICA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans***

ELIANA GABRIELA BELTRÁN VARGAS

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latino-Americano Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de grado en Biotecnología.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná

2023

ELIANA GABRIELA BELTRÁN VARGAS

ANÁLISIS DE LA TOXICIDAD DE LA ATRAZINA DESPUÉS DE BIODEGRADACIÓN FÚNGICA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans*

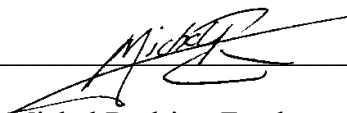
Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latino-Americano Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de grado en Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rafaella Costa Bonugli Santos

UNILA



Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

UNILA



Prof^ª. Dr^ª. Leticia Priscilla Arantes

UEMG

Foz de Iguazú, 14 de Junio del 2023

TÉRMINO DE PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor(a): Eliana Gabriela Beltrán Vargas

Curso: Biotecnología

Tipo de Documento

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduación | <input type="checkbox"/> artículo |
| <input type="checkbox"/> especialización | <input checked="" type="checkbox"/> trabajo de conclusión de curso |
| <input type="checkbox"/> maestría | <input type="checkbox"/> monografía |
| <input type="checkbox"/> doctorado | <input type="checkbox"/> disertación |
| | <input type="checkbox"/> tesis |
| | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuales |
| | <input type="checkbox"/> _____ |

Título del trabajo académico: Análisis de la toxicidad de la Atrazina después de biodegradación fúngica utilizando *Caenorhabditis elegans*

Nombre del orientador(a): Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos

Fecha de Defensa: 14 / 06 / 2023

Licencia no exclusiva de Distribución

El citado autor:

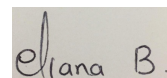
a) Declara que el documento presentado es su trabajo original y que tiene derecho a otorgar los derechos contenidos en esta licencia. Asimismo, declara que la entrega del documento no infringe, hasta donde es posible saber, los derechos de cualquier otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material sobre el cual no posee los derechos de autor, declara que ha obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para otorgar a UNILA – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana los derechos requeridos por esta licencia, y que este material cuyos derechos pertenecen a terceros está claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento presentado se basa en un trabajo financiado o respaldado por una institución distinta a la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, declara haber cumplido con las obligaciones exigidas por el respectivo contrato o convenio.

Como titular de los derechos sobre el mencionado contenido, el autor autoriza a la Biblioteca Latinoamericana – BIUNILA a poner a disposición la obra, de forma gratuita y de acuerdo con la **Licencia Creative Commons 3.0 Unported**.

Foz de Iguazú, 14 de Junio del 2023.



Firma del Responsable

Dedico este trabajo a mis padres, Camilo
E y Clemencia, mis hermanos, Camilo A
y Paula.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Camilo y Clemencia, por creer en mí, apoyarme en cada paso de mi vida, por aconsejarme en los caminos de la vida y ser una mejor persona día a día, por los valores que fueron infundados desde mi niñez hasta este momento. A mis hermanos, Camilo por enseñarme un poco de defensa personal de hermanos útil en cualquier instante de vida, Paula por enseñarme hacerle ropa a las muñecas y que a veces es bueno decir que si.

Agradezco a mi profesora y orientadora Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos por darme la oportunidad de trabajar con ella, por las enseñanzas y correcciones a lo largo de la elaboración de este trabajo. Por mostrarme en sus aulas de clase que esta área en la que basé mi trabajo es la que más me gusta.

Agradezco a la profesora Dr^a. Leticia Priscilla Arantes por mostrarme otra de las áreas que me gustan de esta carrera, ayudarme y tener paciencia conmigo.

Agradezco a mis amigos, Mariaca una de mis mejores amigas en la universidad, la primera vez que nos conocimos pensé “ajá qué chica tan agresiva” quien iba a pensar que meses después nos llevamos bien y que soy igual que ella, por aconsejarme, apoyarme, impulsarme hacer cosas que normalmente no haría, quien diría que mi mejor amiga estuvo viviendo a dos horas de mi casa que literalmente nos podríamos haber saludado sacando la cabeza por la ventana. Chatico mi mejor amigo nunca olvidaré el primer día que nos conocimos me pediste mi celular y te tomaste una foto, me dije que atrevido pero al mismo tiempo de me dio risa y comenzamos a forjar una amistad sincera. Gracias Mariaca y Chatico por hacerme parte de su círculo de amistad y “muy seco mi perro” “ya parió la burra”. Anto nunca pensé que una de las amigas de mi hermana podría convertirse en una de mis amigas, es increíble cuán parecidas somos en lo que pensamos de la vida, en la sociedad y como personas, somos tan parecidas que cumplimos años el mismo día, gracias “hermana gemela de diferente madre, país y año”. A Rutchi, Analia y Allan que forman una parte importante en mi vida y siempre estarán en ella.

Agradezco a mi mejor compañero de vida, mi apoyo emocional ODÍN, Aquella travesía de adopción la volvería a pasar con tal de encontrarme un perro tan parecido a mi, por ahí dicen que las mascotas se parecen a sus dueños y pues si, por enseñarme a cuidar de otro ser, por ser mi calmante de emociones tristes o alegres.

RESUMEN

La actividad agrícola es una de las principales actividades que contaminan o degradan los suelos a causa de la utilización excesiva de sustancias químicas. Uno de los pesticidas más empleados en la agricultura es la Atrazina, debido a su amplio espectro, bajo costo y por presentar efecto residual en el suelo; así también, debido a sus características de solubilidad, adsorción, desplazamiento, persistencia y toxicidad, estos agrotóxicos presentan un gran potencial en contaminar los suelos, las aguas superficiales y subterráneas. En ese sentido, uno de los tratamientos es la biorremediación: actividad de biodegradación de los contaminantes, que usa las actividades metabólicas de ciertos organismos vivos para degradar, remover o transformar los contaminantes a productos metabólicos inocuos. Este trabajo buscó evaluar la efectividad del proceso de biodegradación fúngica de la atrazina utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico. Para ello, fue utilizado los hongos de la Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental - CCMIBA, localizada en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la UNILA, siendo: *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 y *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. Los *C. elegans* fueron expuestos durante 1 h a los ensayos conteniendo los extractos metabólicos producidos con y sin atrazina (10 mg/L), seguidamente lavados, incubados y evaluados diariamente durante 5 días. Fue evaluado la toxicidad frente a la sobrevivencia, desarrollo larval, comportamiento y reproducción del nematodo. El número de bombeos faríngeos fue el único efecto significativo ($p < 0,05$) en los ensayos con el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 en el aumento en relación al CN demostrando que los metabolitos secundarios son menos tóxicos y que la degradación de la atrazina deja la molécula menos tóxica. Los demás factores presentaron valores muy variables entre los dos hongos, incluidos los efectos que probablemente resulten de los metabolitos fúngicos secundarios, independientemente de la atrazina. Aunque los resultados hayan sido promisoros, concluye que la concentración de atrazina no fue suficiente para un efecto toxicológico en *C. elegans*, por eso es sugerido más estudios para comprender mejor el mecanismo envueltos en la biodegradación fúngica de la atrazina, en *C. elegans*.

Palabras clave: Biodegradación; Hongo; Atrazina; Toxicidad; *Caenorhabditis elegans*.

RESUMO

A agricultura é uma das principais atividades que contaminam e degradam os solos, devido ao uso excessivo de substâncias químicas. Um dos pesticidas mais empregados na agricultura é a Atrazina, devido ao seu amplo espectro, baixo custo e por ter um efeito residual no solo; assim também, em razão de suas características de solubilidade, adsorção, deslocamento, persistência e toxicidade, estes agrotóxicos apresentam um grande potencial de contaminação do solo, águas superficiais e subterrâneas. Nesse sentido, um dos tratamentos empregados para mitigar esses danos é a biorremediação: atividade de biodegradação de contaminantes, que utiliza atividades metabólicas de determinados organismos vivos para degradar, remover ou transformar os contaminantes a produtos metabólicos inócuos. Este trabalho buscou avaliar a efetividade do processo de biodegradação fúngica da atrazina, utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico. Para isso, foram utilizados fungos da Coleção de Cultura de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental – CCMIBA, localizada no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Federal da Integração Latino-americana – UNILA, sendo: *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 e *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. Os *C. elegans* foram expostos, durante uma hora aos extratos metabólicos produzidos pelos fungos com e sem atrazina (10 mg/L); posteriormente foram lavados, incubados e avaliados diariamente, durante 5 dias. A toxicidade foi avaliada diante da sobrevivência, desenvolvimento larval, comportamento e reprodução do nematoide. O número de batimentos faríngeas foi o único efeito significativo ($p < 0,05$) nos ensaios com o fungo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 em que o aumento em relação ao CN demonstrou que os metabólitos secundários são menos tóxicos e que a degradação da atrazina resultou em uma molécula menos tóxica. Os demais fatores apresentaram valores altamente variáveis entre os dois fungos, incluindo efeitos provavelmente resultantes de metabólitos fúngicos secundários, independente da atrazina. Embora os resultados tenham sido promissores, conclui-se que a concentração de atrazina não foi suficiente para um efeito toxicológico em *C. elegans*, então novos estudos são necessários para entender melhor o mecanismo envolvido na biodegradação fúngica de atrazina, em *C. elegans*.

Palavras-chave: Biodegradação; Fungos; Atrazina; Toxicidade; *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Fórmula estructural de la atrazina	15
Figura 2 - Formas sexuales de <i>C. elegans</i>	20
Figura 3 - Ciclo de vida individual del <i>C. elegans</i>	21
Figura 4 - Tejidos del <i>C. elegans</i>	22
Figura 5 - Procedimiento de repique para manutención de <i>C. elegans</i>	29
Figura 6 - Proceso de sincronización de los <i>C. elegans</i>	30
Figura 7 - Morfología de la vulva de <i>C. elegans</i> en L3, L4 y etapas adultas	33
Figura 8 - <i>C. elegans</i> adultos con huevos en el útero	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de <i>C. elegans</i> vivos en % de sobrevivencia para los ensayos con <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018	35
Gráfico 2 - Promedio de ocurrencia (%) de las etapas larvales (L1, L2, L3, L4), adulto joven y adultos con huevos) para los ensayos con <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018 en el cuarto día de análisis	36
Gráfico 3 - Promedio general número de <i>thrashes</i> en un intervalo de 20 seg para los ensayos con <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018 en el tercer día de análisis	37
Gráfico 4 - Promedio general del número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 seg para los ensayos con <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018 en el tercer día de análisis ..	38
Gráfico 5 - Promedio general del número de huevos presentes en el útero de los <i>C. elegans</i> adultos para los ensayos con <i>Clonostachys rosea</i> CCMIBA_R018 en el último día de análisis	39
Gráfico 6 - Promedio del número de <i>C. elegans</i> vivos en % de sobrevivencia para los ensayos con <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014	40
Gráfico 7 - Ocurrencia de las etapas larvales (L1, L2, L3, L4, adulto joven y adultos con huevos) para los ensayos con <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 en el cuarto día de análisis	41
Gráfico 8 - Promedio general del número de <i>thrashes</i> en un intervalo de 20 seg. para los ensayos con <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 en el tercer día de análisis	42
Gráfico 9 - Promedio general del número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 seg para los ensayos con <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 en el tercer día de análisis	43
Gráfico 10 - Promedio general del número de huevos presentes en el útero de los <i>C. elegans</i> adultos para los ensayos con <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014 en el cuarto día de análisis	44

LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATZ	Atrazina
C	Control
CE50	Concentración Efectiva Media
CH ₄	Metano
CN	Control Negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
E	Ensayo
EC	Ensayo Control
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
H ₂ O	Agua
LC50	Concentración Letal Media
LD50	Dosis Letal Media
LC-MS/MS	Cromatografía Líquida con Espectrofotometría de Masas
NaOH	Hidróxido de Sodio
UNILA	Universidad Federal de Integración Latinoamericana

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
	2.1 ATRAZINA	17
	2.2 BIODEGRADACIÓN	18
	2.2.1 Biodegradación por hongos <i>Clonostachys rosea</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i>	20
	2.3 MODELO BIOLÓGICO <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
3	OBJETIVOS	29
	3.1 OBJETIVO GENERAL	29
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAL Y MÉTODOS	30
	4.1 OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN DE EXTRACTOS METABÓLICOS	30
	4.2 <i>E. coli</i> OP50 y CEPAS DE <i>C. elegans</i>	31
	4.3 MANUTENCIÓN DE <i>E. coli</i> OP50	32
	4.4 MANUTENCIÓN DEL <i>C. elegans</i>	32
	4.5 SINCRONIZACIÓN DEL <i>C. elegans</i>	33
	4.6 EXPOSICIÓN	33
	4.7 BIOENSAYO	35
	4.7.1 Ensayo de sobrevivencia	35
	4.7.2 Ensayo en el desarrollo larval	36
	4.7.3 Ensayo de locomoción	36
	4.7.5 Ensayo de número de huevos en el útero	37
5	RESULTADOS	38
	5.1 <i>Clonostachys rosea</i> CCMBIA_R018	38
	5.1.1 Ensayo de sobrevivencia	38
	5.1.2 Ensayo en el desarrollo larval	38
	5.1.3 Ensayo de locomoción	39
	5.1.4 Ensayo de bombeos faríngeos	40
	5.1.5 Número de huevos en el útero	41
	5.2 <i>Purpureocillium lilacinum</i> CCMIBA_R014	42
	5.2.1 Ensayo de sobrevivencia	42
	5.2.2 Ensayo en el desarrollo larval	43
	5.2.3 Ensayo de locomoción	44
	5.2.4 Ensayo de bombeos faríngeos	45
	5.2.5 Número de huevos en el útero	46

6	DISCUSIÓN	48
7	CONCLUSIÓN	50
8	REFERENCIAS	51
9	APÉNDICE	59

1 INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de los principales componentes donde ocurre la transferencia de masa y energía en que los minerales, materia orgánica, aire y agua interactúan de forma compleja y dinámica, además de proporcionar el 95% de los alimentos globales directa o indirectamente, tiene diferentes funciones como la capacidad de almacenamiento y retención de agua, nutrientes, contaminantes, y otros, que van a depender de sus propiedades (SILVA *et al.*, 2022).

La actividad agrícola es una de las principales actividades que contaminan o degradan los suelos a causa de la utilización excesiva de los agrotóxicos (RAMÍREZ & GARCÍA, 2020). Los plaguicidas o pesticidas son utilizados desde finales del siglo XIX, con fase de desarrollo a la sombra de las dos guerras mundiales (DOMÉNECH, 2004), y la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos se incrementó desde los inicios del siglo XX (CAMPOS, 2018). Estos compuestos desempeñan un papel importante en la revolución verde, al combatir las plagas que afectaron tanto la calidad como la cantidad en la producción agrícola. En la agricultura moderna el uso de agrotóxicos está basado en la búsqueda de una mayor productividad (SILVA *et al.*, 2022).

Los agrotóxicos son sustancias que tienen como finalidad principal la protección de los productos agrícolas contra la acción de seres vivos que afectan negativamente los productos agrícolas, pero que a causa de ser usados de una manera abusiva, terminan generando riesgos al medio ambiente y a la salud humana (TAVARES *et al.*, 2020). Uno de los pesticidas usados en la agricultura es la Atrazina debido a su amplio espectro para el control de arvenses de hoja ancha y pastos, por tener un bajo costo y por presentar efecto residual en el suelo (TOLLER *et al.*, 2020). Actúa por vía radical y se acumula en las hojas impidiendo la fotosíntesis de las plantas (RODRÍGUEZ-CAMACHO *et al.*, 2021). En razón de las características de solubilidad, adsorción, desplazamiento, persistencia y toxicidad, estos agrotóxicos presentan un gran potencial en contaminar los suelos, las aguas superficiales y subterráneas (TOLLER *et al.*, 2020).

Estas sustancias agrotóxicas representan riesgos en la salud a consecuencia de intoxicaciones agudas y enfermedades crónicas relacionadas a efectos deletéreos (FROTA & SIQUEIRA, 2021). Otros síntomas como dolores de cabeza, náuseas, dolores de estómago, disuria, gastritis, daños en el ADN y alteraciones celulares, también son relacionados a la exposición de agrotóxicos (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). En el caso de la atrazina los problemas causados por la exposición en la salud humana pueden ser agudos como irritación

severa de ojos y piel o hasta crónicos como los relacionados con daños reproductivos (SALAZAR-LEDESMA *et al.*, 2018).

La remediación es una serie de operaciones que alteran la composición de un contaminante por medio de acciones químicas, físicas o biológicas de manera a reducir la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminante. Uno de los tratamientos es el biológico, que es la biorremediación, de la actividad de biodegradación de los contaminantes, que usa las actividades metabólicas de ciertos organismos vivos (hongos, bacterias, plantas) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (SEPÚLVEDA & TREJO, 2002).

En la biorremediación los procesos de degradación natural como la biodegradación, se efectúan mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, ruptura y reorganización de enlaces moleculares los cuales inducen en algunos casos la transformación parcial de las sustancias agrotóxicas en metabolitos con mayor toxicidad, siendo cerca del 50% de los productos de la transformación conteniendo toxicidad similar a la de los compuestos similares (BELFROID *et al.*, 1998). Para asegurar la reducción o eliminación de los efectos tóxicos de los pesticidas debe haber una transformación completa de las moléculas a través de la mineralización, proceso en el que se produce agua, CO₂ y otros minerales (VALDERRAMA *et al.*, 2012).

Varios trabajos sobre tests de toxicidad con la atrazina envolviendo diferentes modelos biológicos son vistos, como en el trabajo de FOUAD *et al.* el cual utilizan la lombriz de tierra *Aporrectodea caliginosa* para probar el efecto tóxico de la atrazina y la metribuzina mediante técnicas de contacto con papel filtro y mezcla del suelo. Las lombrices de tierra son influenciadas velozmente por contaminantes existentes en el suelo, como contaminantes orgánicos, metales y pesticidas; estos animales son propensos a absorber compuestos peligrosos a través de la piel o por ingestión de volúmenes significativos del suelo siendo calificados como bioindicadores de contaminantes. Los resultados mostraron que las toxicidades agudas por medio del test de contacto con papel filtro varían ampliamente, mientras que la prueba de mezcla de suelo es más representativa cuando se evalúa la toxicidad de herbicidas para lombrices de tierra. Otro modelo biológico usado para test de toxicidad es el pez cebra *Danio rerio* como es observado en el trabajo de BLAHOVA *et al.* en la cual evaluaron la embriotoxicidad aguda de la atrazina y sus dos productos de degradación la desisopropilatrazina y la desetilatrazina, y su mezcla en las primeras etapas de vida del pez cebra; evaluando criterios de valoración letales y el desarrollo de trastornos, demostrando que por más que las sustancias individuales y su combinación no se asocian a un efecto negativo

sobre la mortalidad, las concentraciones de atrazina, sus metabolitos o su combinación altas, primordialmente, presentan un riesgo potencial de embriotoxicidad para el pez cebra.

En el desarrollo del proyecto de investigación intitulado “Desarrollo de un proceso de biorremediación de suelos agrícolas basado en la asociación de hongos de suelos y carbón activado” desarrollado en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la UNILA los hongos *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 y *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014, que pertenecen a la Colección de Cultura de Microorganismo de Importancia Biotecnológica y Ambiental - CCMIBA, presentaron degradación de la atrazina en ensayos in vitro. Para evaluar la toxicidad de los ensayos, el presente proyecto utilizará el organismo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) como modelos biológicos, pues es un organismo que comparte semejanzas genéticas con los humanos, simple y multicelular sirviendo como modelo de toxicidad por medio de análisis simples.

Por lo tanto la idea de este trabajo es hacer una evaluación del proceso de biorremediación aisladamente para posterior elaboración de un consorcio de hongos en el plaguicida Atrazina y observar cómo actúan en diferentes aspectos de los *C. elegans*: sobrevivencia, desarrollo, reproducción y comportamiento.

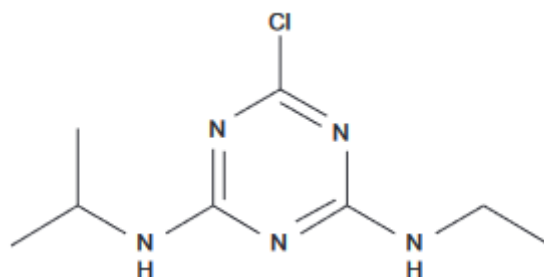
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ATRAZINA

Los agroquímicos como los plaguicidas y los fertilizantes son una parte integral de la agricultura moderna pues aumentan los rendimientos con menor esfuerzo (SRIVASTAV, 2020). Los plaguicidas son un grupo de sustancias a las que pertenecen los insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas, molusquicidas y nematocidas; en la cual se acepta que los pesticidas tienen un papel importante en el desarrollo agrícola pues reducen las pérdidas de productos agrícolas, mejoran el rendimiento y la calidad de los alimentos (TUDI *et al.*, 2021).

La atrazina (nomenclatura 2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) (Figura 1) es un herbicida de clase de las triazinas que más se usa en cultivos de maíz, caña de azúcar, sorgo y pastos debido a su amplio espectro en el control de malezas de hoja ancha, tener un bajo costo y presentar efecto residual en el suelo (TOLLER *et al.*, 2021). Es un compuesto polar, débilmente básico y estable debido a su configuración y su anillo heterocíclico (Figura 1) (CAPPOANI, 2020).

Figura 1. Fórmula estructural de la atrazina



Fuente: Hansen *et al.*, 2013

Tiene una baja solubilidad en agua y una vida media considerablemente extensa de 60 a 100 días y que en diferentes condiciones ambientales, secas o frías, puede persistir en el ambiente durante más de un año (KIM *et al.*, 2011). Su uso generalizado en los últimos 50 años ha llevado a la contaminación de los suelos, las aguas subterráneas, los ríos y lagos (FERNANDES *et al.*, 2020).

La atrazina actúa en la membrana del cloroplasto, lugar donde sucede la fase luminosa de la fotosíntesis, al ser un inhibidor del fotosistema II de las plantas impide el flujo normal de electrones, provocando clorosis foliar seguida de una necrosis (CAPPOANI, 2020). El

mecanismo de acción de la atrazina en el metabolismo mitocondrial sucede a través de la inhibición de la ATP sintasa aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales provocan resultados en disfunciones metabólicas en organismos no objetivo (SILVA, 2021).

Los principales efectos de la atrazina en la salud humana están en los sistemas endocrino, nervioso central, inmunológico y reproductivo (MATÍAS *et al.*, 2021); al actuar como un potente disruptor endocrino causa alteraciones en la señalización de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) a la hipófisis resultando en la interrupción de la secreción de la hormona luteinizante (LH) (FORADORI *et al.*, 2013), provocando la pérdida de función reproductiva, cáncer de ovario, cáncer de mama entre otros problemas (HE *et al.*, 2019).

2.2 BIODEGRADACIÓN

El proceso de degradación de los pesticidas es hecho por microorganismos, reacciones químicas o la luz, que dependiendo de las condiciones ambientales y características químicas del plaguicida este proceso de degradación puede durar entre horas, días o incluso años, también esta degradación produce diferentes metabolitos (TUDI *et al.*, 2021). La degradación microbiana es hecha por microorganismos como las bacterias y los hongos, llamado biodegradación.

Este proceso de biodegradación de plaguicidas dependerá de la diversidad microbiana, como también de la capacidad de tolerar o sobrevivir en la presencia del compuesto, de sintetizar enzimas o complejos enzimáticos que biotransforman la sustancia química xenobiotica en una molécula más simple y menos nociva para el medio ambiente y la salud humana (SOUZA *et al.*, 2017). El proceso de biodegradación puede ocurrir mediante metabolismo o co-metabolismo; el metabolismo sucede cuando la molécula xenobiotica, plaguicida, puede ser quebrada de manera parcial teniendo como producto compuestos intermediarios, los cuales pueden tener características como toxicidad, movilidad y persistencia mayor comparada con la molécula original, o ser quebrada de manera total donde se tiene una mineralización del plaguicida resultando en compuestos más simples; por otro lado, la biodegradación a través del co-metabolismo el pesticida va a ser degradado, pero este no es usado por los microorganismos como fuente suplementaria de energía (SOUZA, 2020).

El proceso de biodegradación del herbicida atrazina puede ser hecho a través de un consorcio de microorganismos aerobios como anaerobios, donde ellos pueden utilizar la

atrazina como fuente de carbono y/o nitrógeno. La biodegradación aerobia de la atrazina consiste en el uso de un donador de electrón donde el receptor final es el oxígeno y como resultado se tiene la generación de CO₂ Y H₂O, en sus procesos metabólicos ocurre la degradación del compuesto orgánico como fuente de carbono y la producción de biomasa; la biodegradación anaerobia resulta en la biotransformación de constituyentes orgánicos en moléculas más simples, como CH₄, CO₂, amonio, sulfatos y fosfatos, en este caso ocurre por el uso de diferentes receptores de electrones, realizado por reacciones bioquímicas como hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis (MATÍAS *et al.*, 2021). Los intermediarios metabólicos que se forman, con las interacciones entre los elementos bióticos y abióticos del suelo con la atrazina, son la hidroxiatrazina, la desetilatrazina, desisopropilatrazina, N-isopropilammilida y el ácido cianúrico, a partir de bacterias que mismo así puede haber una variedad de metabolitos (KOLEKAR *et al.*, 2014); por otro lado, los principales intermediarios metabólicos formados por la degradación fúngica son la desisopropilatrazina y la desetilatrazina (MASAPHY *et al.*, 1993).

Naturalmente los hongos son capaces de degradar la atrazina del suelo mediante el proceso de N-desalquilación, usando el mecanismo de biodegradación intracelular, por medio del complejo de enzimático del citocromo P450 o por enzimas extracelulares en las que se encuentran las lignina, peroxidasa de manganeso y lacasa, siendo responsables por oxidar estructuras fenólicas y no fenólicas (NGUYEN *et al.*, 2014; NICODEMO, 2021). La degradación fúngica de la atrazina es basada en el mecanismo Hidrolítico-oxidativo, en el que varias especies de hongos son capaces de degradar la atrazina removiendo secuencialmente los sustituyentes del anillo aromático, llamado este proceso de desalquilación, siendo este el primer paso, en el cual los hongos producen los metabolitos deisopropilatrazina (DIA), deetildeisopropilatrazina (DEDIA), hidroxiatrazina (HA) y desetilatrazina (DEA) que aun tiene el anillo aromático (HENN *et al.*, 2020).

Con todo, la ecotoxicología es una rama de la ciencia que estudia y analiza los efectos de agentes químicos y físicos sobre organismos vivos, enfocándose principalmente en poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos (RONCO *et al.*, 2004). La evaluación del riesgo ecológico es un proceso de asignación de magnitudes y probabilidades a los efectos adversos de actividades antrópicas y catástrofes naturales; donde se acude tanto a métodos predictivos para la evaluación de la exposición, como de los efectos de sustancias tóxicas a distintos niveles de organización y nivel trófico, siendo este último aspecto de especial interés para el uso de técnicas bioanalíticas de diagnóstico con ensayos de toxicidad (SUTER, 1993).

Los efectos de sustancias químicas antropogénicas vienen siendo estudiadas a nivel de organismos, de poblaciones y de los ecosistemas, ya que en la mayoría de los casos no es posible la eliminación de la toxicidad; como en el proceso de la biodegradación, anteriormente mencionado, por el cual la biotransformación de la molécula puede dejar el compuesto más o menos tóxico. La información obtenida por los ensayos de toxicidad a pesar de que su alcance es limitado para la extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, siguen siendo la fuente de información predominante para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos (RONCO *et al.*, 2004). Existen variados organismos y protocolos estandarizados para realizar los ensayos de toxicidad y todos poseen finalidades similares: determinar la concentración de algún material o nivel de algún agente, capaz de producir un efecto deletéreo en un organismo durante una exposición de corta duración, bajo condiciones controladas (MONTT, 2012).

2.2.1 Biodegradación por hongos *Clonostachys rosea* y *Purpureocillium lilacinum*

Como biodegradadores, los hongos son conocidos por su diversidad y notable capacidad de degradar materiales naturales complejos y persistentes como la lignina, quitina y la celulosa; además características como crecer en condiciones estresantes, pH ácido, pocos nutrientes y con baja actividad de agua, favorecen su desarrollo y capacidad de degradar en comparación de otros microorganismos (ATAGANA *et al.*, 2006).

Clonostachys sp. es un micoparásito, perteneciente al filo Ascomycota que presenta actividad en control biológico, biodegradación, biotransformación, fuentes biológicas de energía, fermentación, donde se encuentra la especie *Clonostachys rosea* una especie que está extendida en todo el mundo y existe en muchos tipos de hábitats, mayormente en el suelo (SUN *et al.*, 2020). Este hongo es conocido por colonizar raíces, tallos, vainas, hojas y semillas de especies de plantas, teniendo la capacidad de permanecer endofíticamente (SARAIVA *et al.*, 2014). Existen varias clases de metabolitos secundarios de *Clonostachys* sp. que exhiben actividades biológicas como antimicrobianas, insecticidas, nematocidas, antiparasitarias, fitotóxicas y citotóxicas (HAN *et al.*, 2020).

Purpureocillium lilacinum es un hongo filamentoso cosmopolita encontrado en el suelo donde es capaz de acceder en sus huéspedes, desde insectos, nemátodos hasta el ser

humano, también vive en saprofitismo en el aire y vegetales en descomposición (LÓPEZ-MEDRANO *et al.*, 2015). Son capaces de producir varios metabolitos secundarios de diferentes clases como: xantonas, péptidos, alcaloides, policétidos, α -pironas, que tienen actividades biológicas diversas (CHAGAS JR. *et al.*, 2020). Este hongo filamentoso tiene la capacidad de biodegradar hidrocarburos (BENGUENAB & CHIBANI, 2021), en estudios usando *Purpureocillium lilacinum* como biorremediación de ftalatos, se muestra una total degradación del compuesto (AKHTAR & MANNAN, 2020).

En este proceso de biorremediación puede haber una biodegradación completa donde hay una quiebra de manera total del compuesto contaminante, resultando en una sustancia más simple y con toxicidad menor o nula, como es el caso de los hongos de la podredumbre blanca, *Bjerkandera sp*, que poseen enzimas oxidativas esenciales para la degradación de lignina y por lo tanto son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (CHÁVEZ *et al.*, 2013). Un inconveniente es la biodegradación incompleta, proceso por el cual se tiene una producción de metabolitos intermediarios nocivos de igual o mayor toxicidad que el compuesto inicial por medio de la biodegradación incompleta. La producción de sustancias tóxicas o inactivadas cuando son metabolizadas después del proceso de biodegradación dependerá del microorganismo usado para el proceso de biodegradación.

El hongo *P. lilacinum* es citado en diversos estudios en el tratamiento de contaminantes primordialmente por su potencial de ftalatos, compuestos aromáticos como la atrazina; y por su capacidad de control biológico con nematodos que atacan a las plantas. Otros estudios han señalado que el hongo *P. lilacinum* presenta resistencia a varios productos químicos incluyendo productos utilizados normalmente en la agricultura como los insecticidas. Estudios usando el hongo *C. rosea* que actúan principalmente en patógenos presentes en la rizosfera, relatan que entre los pesticidas existentes, solamente fungicidas presentan inhibición en el crecimiento de *C. rosea*, y su resultado es observado en insecticidas y herbicidas, como por ejemplo hongos de la especie *Fusarium C. rosea* cuyo objetivo fue el estudio para la descomposición de algunos alquilfenoles, principalmente usados en la fabricación de detergentes, emulsificantes y pesticidas (BONASSA, 2019).

2.3 MODELO BIOLÓGICO *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un pequeño nematodo de vida libre que se encuentra en todo el mundo. Su nombre *Caenorhabditis* es del griego *caeno*, que significa “nuevo” o

“reciente” y *rhabditis* que significa “bastón”; *elegans* del latín que quiere decir elegante. Las larvas recién nacidas miden 0,25 milímetros de largo y los adultos miden 1 milímetro de largo. En 1965, Sydney Brenner decidió por *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo para estudiar el desarrollo y el comportamiento animal, ya que proporciona un gran potencial para análisis genético, en parte debido a su ciclo de vida rápido (3 días), tamaño pequeño y facilidad de cultivo en laboratorio (RIDDLE *et al.*, 1997). El genoma de *C. elegans* contiene 8×10^7 pares de bases de ADN, aproximadamente 20 veces el de *E. coli* y la mitad que el de *Drosophila* (REEVE, 1988). Genéticamente lo vuelve un buen modelo biológico puesto que comparte muchos genes y vías metabólicas con los seres humanos; al menos el 38% de los genes que codifican proteínas de *C. elegans* tienen ortólogos predichos en el genoma humano, entre un 60 y el 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans*, ya un 40% de los genes que se conocen que están asociados con enfermedades de seres humanos tienen ortólogos evidentes en el genoma *C. elegans* (SHAYE & GREENWALD, 2011).

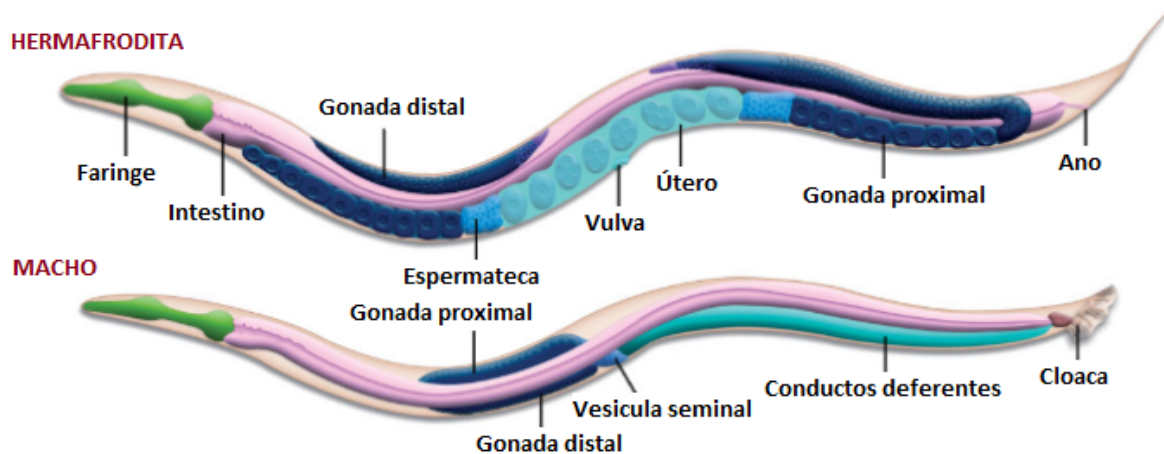
El nematodo *C. elegans* como modelo biológico tiene una gran ventaja de fácil crecimiento y mantenimiento en el laboratorio. En el laboratorio el gusano se cultiva en placas con agar conteniendo *E. coli* en la superficie, del cual se alimentará el *C. elegans*; cuando terminan de consumir totalmente la *E. coli* y sin alimento se detiene el desarrollo de los *C. elegans* jóvenes en estado larvario permitiendo la sobrevivencia durante al menos un mes, este stock no requerirá de constante alimentación. Para reactivarlos se transfiere un trozo del agar de la placa vieja a una nueva con bacterias reanudando su desarrollo (CORSI *et al.*, 2015).

Otras características que facilitan el mantenimiento y el crecimiento de los *C. elegans* son: la autofecundación debido a que es un organismo hermafrodita; al ser un animal de tamaño pequeño se pueden cultivar muchos en un espacio reducido, se pueden criar en temperaturas que oscilan entre 12° y 25°C; pueden sincronizarse al aislar las larvas recién nacidas y adultos grávidos con lejía permitiendo el aislamiento de los huevos resistentes (CORSI *et al.*, 2015).

El tipo salvaje de *C. elegans* tiene 2 sexos naturales, machos XO y hermafroditas XX (Figura 2). Las hermafroditas que son hembras autofértiles con capacidad de hacer que un limitado de espermatozoides se use solamente para autofertilización interna que en presencia de macho tendrá una preferencia en usar su esperma produciendo más descendencia, mientras tanto, los machos pueden producirse por eventos raros y espontáneos de no disyunción del cromosoma X durante la reproducción hermafrodita o de progenie cruzada en un

apareamiento entre macho y un hermafrodita (MEYER, 1997). Naturalmente los *C. elegans* producen predominantemente hermafroditas autofecundantes, pero se puede producir cruzamiento permitiendo el desarrollo de machos fértiles y completamente naturales, sugiriendo que el sexo masculino es mantenido por la selección natural (EMMONS, 2014).

Figura 2. Formas sexuales de *C. elegans*



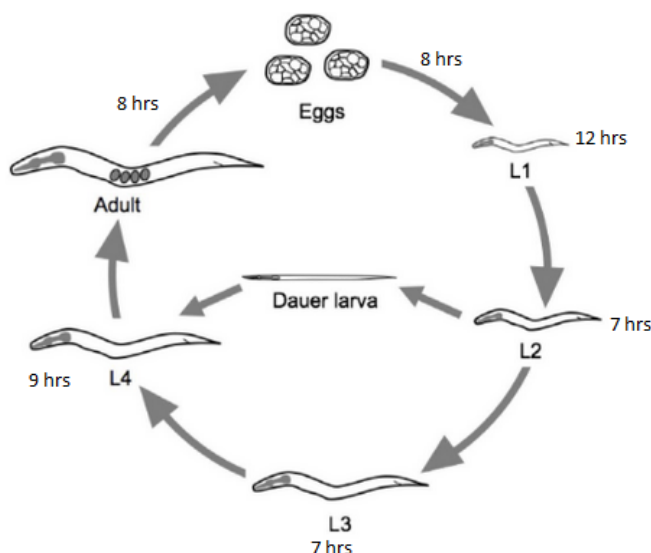
Fuente: Adaptado de Corsi *et al.*, 2015.

Las hermafroditas se utilizan casi que exclusivamente en las investigaciones porque son más comunes y fáciles de mantener, pero no se sabe si la resistencia a factores ambientales difiere entre los sexos, evolutivamente se puede esperar que los machos de *C. elegans* tengan una mayor necesidad de resistencia al estrés probablemente por que se encuentran en entornos hostiles y deben buscar pareja; esto se debe a que las tasas de no disyunción se incrementan en entornos hostiles (PILOTO *et al.*, 2022). Igualmente los machos son importantes porque permiten el intercambio del material genético que es necesario para generar animales diferentes genéticamente y mapear genes (CORSI *et al.*, 2015).

El ciclo de vida del *C. elegans* es corto, aproximadamente de 2-3 semanas, y su proceso de embriogénesis tarda entre 16 a 20 horas a 20°C. Posterior a la etapa de fertilización el embrión se desarrolla de forma independiente de la madre en una cáscara de huevo que fue formada. Los huevos conteniendo los embriones permanecen en dentro de la hermafrodita hasta que son depositados. El embrión eclosiona y se convierte en una larva de primera etapa (L1)(Figura 3). A partir de este momento los *C. elegans* comienzan a alimentarse y seguir desarrollándose a través de 4 etapas larvianas, siendo L1, L2, L3 y L4; que durante cada etapa hay un período de lethargus que consiste en la formación de una

nueva cutícula y que termina con la muda de la vieja cutícula. Después de la muda L4, los hermafroditas adultos empiezan a producir descendencia por un periodo de 2 a 3 días hasta que han usado todo su esperma producido por sí mismos. Cuando el alimento de los *C. elegans* se agotan, las bacterias *E. coli*, las larvas en etapa larval L2 activan un ciclo alternativo cambiando a una etapa larvaria L3 llamada larva dauer, como se muestra en la figura 3. Esta larva L3 dauer tiene una cutícula que rodea completamente al *C. elegans* obstruye la boca e impide que coma, consecuentemente deteniendo el desarrollo; estas larvas pueden sobrevivir por mucho tiempo y son la forma de dispersión más común en la naturaleza. Cuando las larvas dauer son transferidas a las placas conteniendo bacterias *E. coli* la obstrucción en la boca es perdida y continúa con su desarrollo de larvas L4 un poco diferentes (CORSI *et al.*, 2015).

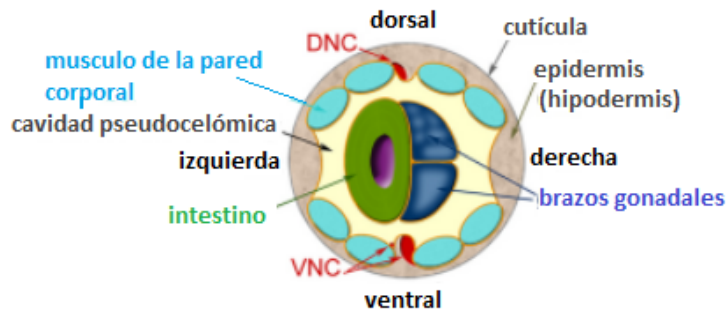
Figura 3. Ciclo de vida individual del *C. elegans*



Fuente: Adaptado de Galimov & Gems, 2020

Este organismo animal es un gusano redondo de estructura tubular cuya transparencia y arquitectura simple, donde sus órganos internos también son tubulares (ZHANG *et al.*, 2017). Los *C. elegans* además de la simplicidad tienen una característica atractiva en la cual posee tejidos bien definidos: epidermis, músculo, aparato digestivo, sistema nervioso y aparato reproductor (Figura 4) (ILLERA, 2016). Dentro de la epidermis se encuentran las bandas musculares, los cordones nerviosos ventrales y dorsales los cuales inervan los músculos; y dentro de la región neuromuscular está el sistema digestivo, excretor y reproductivo (CORSI *et al.*, 2015).

Figura 4. Tejidos del *C. elegans*.



Fuente: Adaptado de Corsi *et al.*, 2015.

La epidermis llamada también de hipodermis es el tejido exterior que durante el proceso de embriogénesis se producen fusiones celulares que sea un largo sincitio epidérmico; estas células van a secretar la cutícula compuesta de colágeno, lípidos y glicoproteínas (ILLERA, 2016). Esta cutícula es una barrera impermeable entre el animal y su entorno, es esencial en el mantenimiento de la morfología e integridad del cuerpo, y cuyo papel fundamental es en la locomoción a través de las uniones a los músculos de la pared del cuerpo permitiendo la contracción muscular (PAGE & JOHNSTONE, 2007).

Las células musculares de la pared corporal de *C. elegans* se dividen en 4 cuadrantes que se extienden a lo largo del gusano, justo en el interior y conectado a la epidermis (BENIAN & EPSTEIN, 2011). Tienen músculos estriados y no estriados, entre los músculos no estriados incluyen los músculos faríngeos, intestinales, uterinos, vulvares y anales; y los músculos estriados son los músculos de la pared corporal (LECROISEY *et al.*, 2007). La contracción y relajación alternantes de los cuadrantes ventral y dorsal permiten el movimiento de serpiente del *C. elegans* sobre una superficie semisólida (BENIAN & EPSTEIN, 2011). El sistema nervioso de *C. elegans* se compone de un conjunto de paquetes de procesos paralelos interconectados, que corren longitudinal o circunferencialmente, adyacentes al tejido hipodérmico, la inervación de los músculos se da de manera en que las células musculares envían extensiones al cordón ventral y dorsal para recibir sinapsis al paso de las neuronas motoras (WHITE *et al.*, 1986).

El tracto digestivo de *C. elegans* consta de diferentes módulos anatómicos y funcionales: la faringe anterior y posterior, el intestino y el recto (KORMISH *et al.*, 2010). Cuando el alimento entra por la boca este ingresa por la parte anterior pasando a través de la faringe donde se trituran el alimento antes de que pase al intestino para su futura digestión

(CORSI *et al.*, 2015). El intestino es un simple tubo que suma el 80% de la longitud del animal, que sirve como el principal sitio de digestión y absorción, y que también cumple funciones del hígado, infección por patógenos, de inmunidad, longevidad y desintoxicación de metales. En *C. elegans* hermafroditas el intestino sirve como sitio de producción de la vitelogenina, que es secretada y absorbida por los ovocitos en desarrollo (DIMOV & MADURO, 2019)

El sistema nervioso del *C. elegans* hermafrodita está compuesto por 302 neuronas organizadas en varios ganglios en la cabeza, en la cola y en un cordón nervioso ventral, algo similar a la médula espinal (WHITE *et al.*, 1986). Casi que todas las neuronas tiene una estructura simple con una o dos neuritas, estas forman sinapsis entre sí en 4 áreas principales: el anillo nervioso, el cordón nervioso ventral, el cordón nervioso dorsal y el neuropilo de la cola (CORSI *et al.*, 2015). Las neuronas pueden llegar a realizar más de 7000 sinapsis químicas y conexiones de enlaces gap (WHITE *et al.*, 1986). Como ya fue mencionado anteriormente, en los nematodos los músculos envían proyecciones celulares a las neuronas motoras para recibir sinapsis; también este animal usa muchos de los neurotransmisores más comunes como: la acetilcolina, glutamato, el GABA, dopamina y serotonina. Además de las sinapsis químicas, las neuronas de estos gusanos son moduladas por señales neuroendocrinas que participan en varios comportamientos como la formación de larva dauer, la locomoción, la puesta de huevos, la mecanosensación y la quimiosensación (LI & KIM, 2008).

En el sistema reproductivo de este organismo que consta de dos partes, las células germinales y los tejidos reproductivos, influyen en la duración de la vida del *C. elegans*, la eliminación de las células germinales aumenta la longevidad, y esta longevidad requiere la gónada somática (YAMAWAKI *et al.*, 2008). El tejido reproductivo en los *C. elegans* varía en diferencias anatómicas en la gónada somática, las estructuras sexuales secundarias y el tamaño corporal, dependiendo si es macho o hermafrodita. Las gónadas somáticas en los hermafroditas constan de 2 tubos en formato de u con imagen de espejo, en los machos estas gónadas somáticas constan de un solo lóbulo en forma de u (CORSI *et al.*, 2015). La vulva del *C. elegans* hermafrodita se desarrolla en el centro de la epidermis en el lado ventral durante el desenvolvimiento de larva, cuando el animal ya es adulto está vulva es necesaria para poner los huevos y para la cópula con los machos (Figura 2) (STERNBERG, 2005). En el caso de los machos adultos, por tener gónadas pequeñas y ausencia de embriones

desarrollándose, son más delgados que los hermafroditas y su estructura secundaria sexual de apareamiento es la cola en forma de abanico (Figura 2) (CORSI *et al.*, 2015).

Con todo lo anteriormente comentado, *C. elegans* se ha convertido en un poderoso modelo para la toxicología ambiental, principalmente para el estudio de la genotoxicidad química (LEUNG *et al.*, 2008). Durante el proceso de biodegradación, la sustancia a ser degradada, sufre biotransformación pudiendo dejar más tóxico los metabolitos formados. Siendo la atrazina una sustancia DE (Disruptora endocrina) causando efectos en el sistema endocrino en el ser humano, posiblemente los metabolitos generados de la biodegradación fúngica pueden quedar más tóxicos. Es por esto que dada la sensibilidad a los tóxicos el *C. elegans* es utilizado para evaluar la toxicidad de las sustancias químicas disruptoras endocrinas (DEs), sustancias que pueden tener efecto en la fisiología y en la expresión génica (CALVOPÍÑA *et al.*, 2021). El estudio de toxicidad en los *C. elegans* proporciona resultados en el sistema digestivo, reproductivo, endocrino, sensorial y neuromuscular; mediante evaluaciones morfológicas de las anomalías inducidas por la toxina y correlaciones neurológicas/conductuales detalladas, siendo un ensayo de toxicidad la clasificación de LD50 (HUNT, 2017).

Diversos trabajos han ido utilizando los *C. elegans* para evaluar la toxicidad de la atrazina y otros pesticidas. El estudio de JACQUES *et al.* (2017) relatan el uso de nanopartículas cargadas de pesticidas (Atrazina, simazina y paraquat) evaluando LC50, reproducción y longitud corporal demostrando que las nanopartículas cargada solamente con atrazina es tóxica para la tasa de desarrollo reduciendo significativamente la longitud de los gusanos, incluso cargadas en concentraciones bajas de atrazina. Por otro lado, en el estudio de ZHOU *et al.* (2021) evaluaron los efectos tóxicos de la atrazina en diferentes concentraciones observándose una disminución significativa de la longitud corporal y la vida útil de los nematodos, como también la reducción en el comportamiento de locomoción y disminución en el tamaño de las crías de los nematodos. En formulaciones a base de glifosato (GBF) y atrazina (ABF), en el caso de la formulación de atrazina expuestas en concentraciones diferentes, en los *C. elegans* causó una letalidad aditiva, la inhibición de la locomoción en concentraciones mínimas y máximas, y el tamaño de la cría fue reducida, mostrando que se indujeron respuestas tóxicas relacionadas con el estrés oxidativo en *C. elegans* como relatan en el estudio de GARCÍA-ESPIÑEIRA *et al.* (2018).

Todas estas características de los *C. elegans* hacen que, además de ser un organismo multicelular, presente en estudios muchas ventajas, ya que los efectos de cualquier sustancia pueden ser evaluados de manera sistémica o concentrada (MEDRADES, 2023). Es ideal, pues este gusano nematodo es simple pero comparte muchos genes y vías moleculares, siendo que muchas de esas señales moleculares que controlan su desarrollo también se encuentran en organismos más complejos, como los humanos. Como también, muchos de los genes del genoma tienen equivalentes funcionales humanos convirtiéndolo en un modelo útil para explorar enfermedades humanas. Con todo, este nematodo satisface los criterios para ser adoptado como bioindicador en toxicología, pues es un organismo sensible a los tóxicos sometidos a prueba, como también el fácil manejo en laboratorio y disponibilidad durante todo el año (WAH CHU & CHOW, 2002). Se ha demostrado que el nematodo *C. elegans* es un organismo valioso en la evaluación de riesgos ecológicos tanto en ambientes acuáticos como en el suelo, teniendo en cuenta que muchos de los procesos fisiológicos básicos y las respuestas al estrés que se observan en organismos superiores, se conservan en los nematodos. Por lo tanto, estos ensayos toxicológicos usando el nematodo *C. elegans* son útiles no sólo para evaluar la contaminación ambiental sino también para predecir el modo de acción de un contaminante como la toxicidad de metales pesados (CLAVIJO *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad del proceso de biodegradación fúngica de la atrazina utilizando *C. elegans* como modelo biológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos metabólicos de la atrazina usando los hongos *Clonostachys rosea* y *Purpureocillium lilacinum*.
- Analizar los efectos de los metabolizados en la sobrevivencia de los *C. elegans*.
- Evaluar los efectos de los metabolizados en el desarrollo larval de los *C. elegans*.
- Observar si hay alteraciones comportamentales de los *C. elegans* cuando son expuestos a los metabolizados.
- Examinar si los metabolizados causan algún cambio en la reproducción de los *C. elegans* cuando son expuestos a estas.

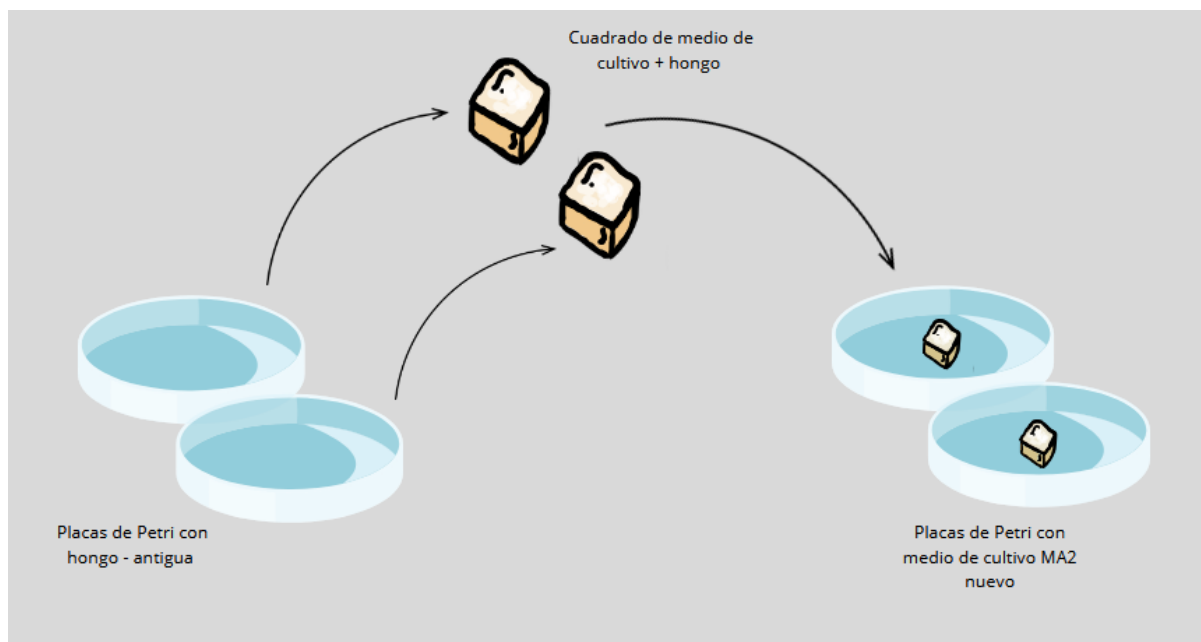
4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN DE EXTRACTOS METABÓLICOS

Los hongos utilizados en este trabajo fueron seleccionados con base en el trabajo de conclusión de la carrera de Biotecnología de la alumna Alessandra Andretta titulado “Análisis de la fitotoxicidad de la atrazina después de la biodegradación fúngica con *Cucumis sativus*” (2022). Todos pertenecen a la Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental - CCMIBA, localizada en el laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la UNILA, siendo: *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 y *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

Los hongos de CCMIBA a usar, fueron reactivados de la misma manera. Para la reactivación fue transferido un cuadrado a una placa de Petri con medio nuevo y se dejó incubar a 28°C por 7 días, como se muestra en el esquema 1. El nuevo medio fue preparado con malta 20 g/L + agar 15 g/L.

Esquema 1. Representación gráfica de la reactivación de los hongos.

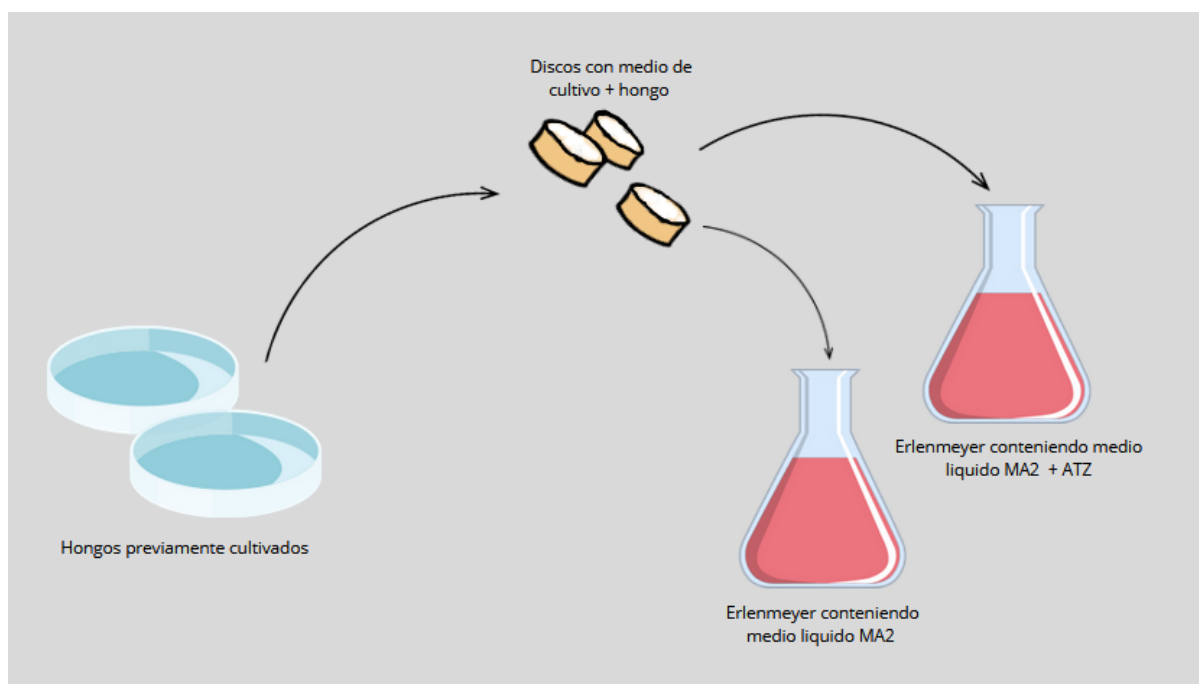


Fuente: La autora

La inoculación de los ensayos consto en la transferencia de 3 discos de 5mm, estos discos fueron hechos utilizando la cabeza de punteras esteril de 1000 µl en el medio sólido de

los hongos previamente cultivados para la inoculación, a los Erlenmeyer que contienen 50 mL del medio líquido MA2 (2% de extracto de malta + 10 mg/ml ATZ), como se observa en el esquema 2; fueron incubados en shaker a 150 rpm y 28°C por 10 días (ANDRETTA, 2022).

Esquema 2. Representación gráfica de la inoculación de los ensayos.



Fuente: La autora

Por cada hongo, tres ensayos se realizaron y cada uno por triplicado (3 ensayos x 3 réplicas), para un total de nueve Erlenmeyers, siendo que 6 tenían ATZ (CN y E) y tres sin ATZ (EC). Pasado el tiempo de incubación de los ensayos posteriormente, fue centrifugado y el sobrenadante conteniendo los extractos metabólicos recuperado.

4.2 *E. coli* OP50 y CEPAS DE *C. elegans*

La bacteria *E. coli* OP50, fue empleada como alimento de los *C. elegans*, debido al crecimiento limitado que ofrece por ser auxotrófico de uracilo, que como resultado, no se forma una capa gruesa. También facilita la observación de los gusanos. Todo el proceso de manipulación de *E. coli* se llevó a cabo de acuerdo con Stiernagle (2011).

La cepa de *C. elegans* que fue usada es la salvaje (N2), que es cedida por el Laboratorio de Neuroprotección y Neurotoxicología Experimental de la Universidad Federal de Santa Maria (UFSM).

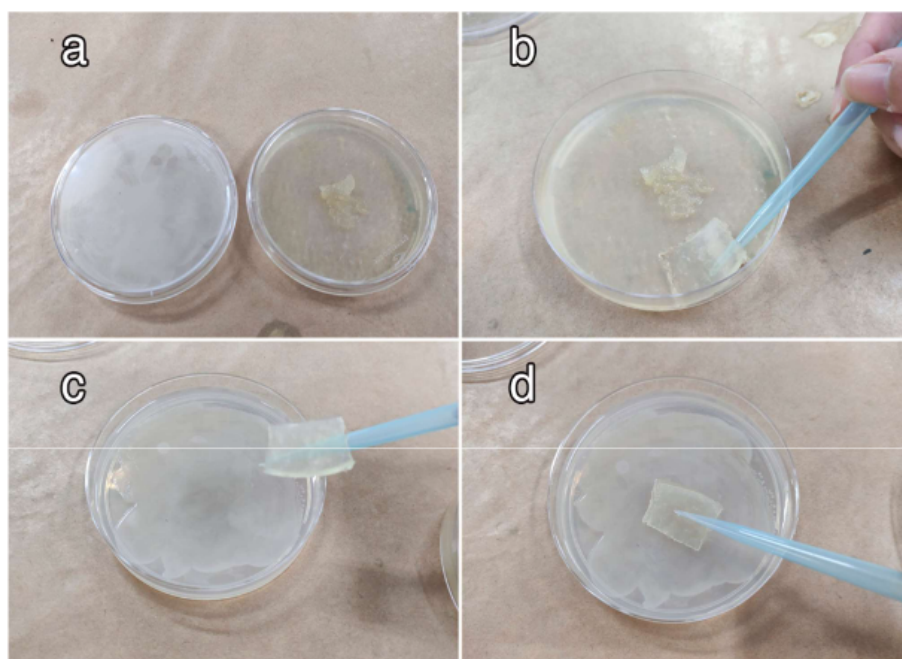
4.3 MANUTENCIÓN DE *E. coli* OP50

Las bacterias *E. coli* OP50 utilizadas fueron mantenidas en medio caldo lisogenia Luria Bertani (LB). Una colonia de las bacterias de una placa stock con LB sólido se transfirió al medio líquido LB previamente preparado; este se llevó a la estufa a 37°C por 24 h para su crecimiento. Pasadas las 24 h, se trasladó a la heladera a 4°C para su posterior almacenamiento. Se realizarán repiques a cada 4 semanas, o cuando sea necesario.

4.4 MANUTENCIÓN DEL *C. elegans*

Los *C. elegans* se mantuvieron en medio de crecimiento sólido Nematode Growth Medium (NGM) sembradas con *E. coli* OP50 en placas de petri a 20°C, conforme el protocolo de Brenner (1974). El medio NGM está compuesto por NaCl, peptona, agar y agua destilada, y la posterior adición de sales, siendo: 1M CaCl₂, 1M MgSO₄, 1M KPO₄ buffer, 5 mg/mL colesterol, nistatina, 100 mg/mL sulfato de estreptomicina. Para el procedimiento fueron realizados repiques de las placas stock a nuevas placas con NGM y *E. coli* OP50, a cada 3 semanas, aproximadamente, para la manutención de los gusanos (Figura 5).

Figura 5. Procedimiento de repique para manutención de *C. elegans*. a) en la izquierda placa con NGM y *E. coli*, en la derecha placa stock de la cepa N2. b) corte cuadrangular de la placa stock con N2. c) Transferencia del cuadrado previamente cortado a la placa con NGM y *E. coli*. d) el cuadrado es colocado en la placa dejando la porción que tiene los *C. elegans* boca abajo.

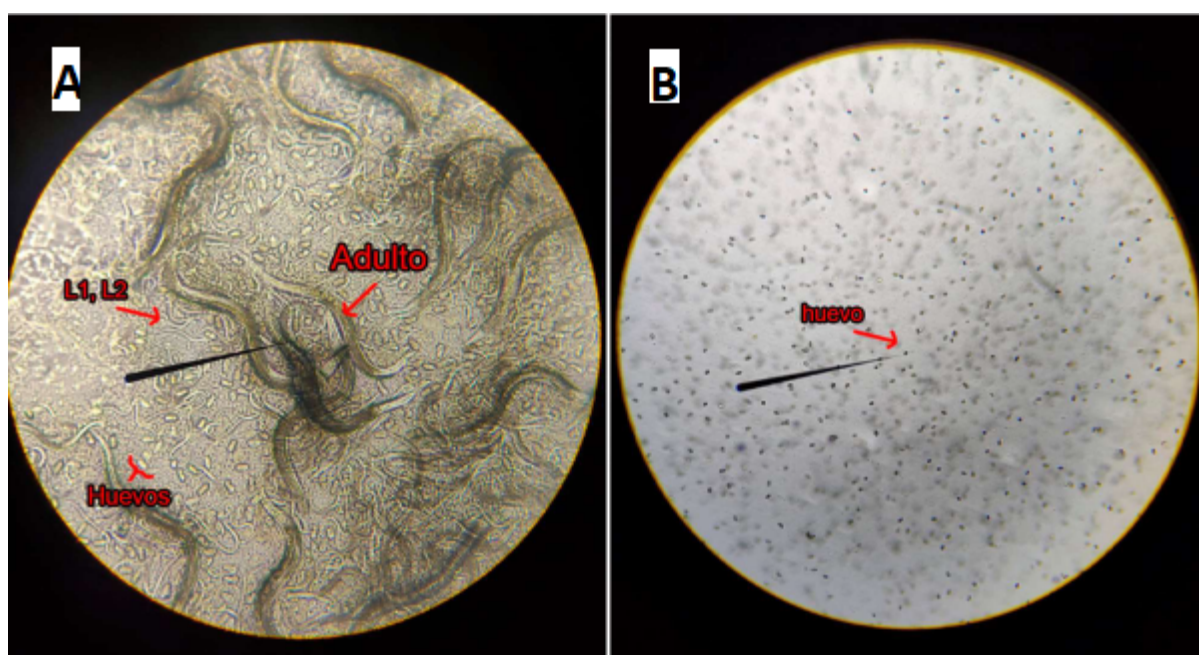


Fuente: Garcete, 2022.

4.5 SINCRONIZACIÓN DEL *C. elegans*

La sincronización cronológica permite que todos los gusanos esten en un mismo estado. Los *C. elegans* adultos con huevos se sometieron a 5 mL solución de bleaching, formada por: Hipoclorito de sodio 1,5 mL; NaOH 0,250 mL y H₂O destilada autoclavada 3,250 mL. Esto permite la disolución de la cutícula y así la expulsión de los huevos a la superficie. Después se agregó el tampón M9 compuesto por: KH₂PO₄, NaHPO₄, NaCl, agua y 1M MgSO₄; para parar el proceso de rompimiento, y fue llevado a centrifugación. El proceso anterior se repitió 3 veces. Es retirado parte del sobrenadante dejando solo 2 mL, este es colocado en placa de petri conteniendo tampón M9, en ausencia de alimento; y son dejados en la incubadora a 20°C por 24 h (Figura 6). Los huevos resistentes al tratamiento de bleaching, después de la incubación eclosionan y están en el estado larval L1 (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012).

Figura 6. Proceso de sincronización de los *C. elegans*. A) *C. elegans* antes de la sincronización. B) *C. elegans* después de la sincronización.



Fuente: Garcete, 2022.

4.6 EXPOSICIÓN

Para realizar la exposición en los *C. elegans*, se colocaron un aproximado de 1000 gusanos en etapa larval L1 en cada tubo Eppendorf y seguidamente fue aplicada la muestra de sobrenadante correspondiente, sin sustrato, por un periodo de 1 h, conforme descrito en la

tabla 1. Posteriormente, los gusanos se lavaron 3 veces con el tampón M9 para retirar los restos de la muestra y se adicionaron aproximadamente 100 *C. elegans* a las placas conteniendo NGM enriquecidas con *E. coli* OP50. Después de 24 h, fueron realizados los bioensayos. Este procedimiento se realizó para cada lote.

Tabla 1. Descripción de tratamientos ejecutados para cada lote experimental

	Control (C)	Control Negativo (CN)	Ensayo (E)	Ensayo Control (EC)
Lote 1	<i>C. elegans</i> + M9	<i>C. elegans</i> + sobrenadante del extracto del control negativo (medio líquido + ATZ)	<i>C. elegans</i> + Sobrenadante del extracto del ensayo (medio líquido + <i>Clonostachy rosea</i> + ATZ)	<i>C. elegans</i> + Sobrenadante del extracto del ensayo control (medio líquido + <i>Clonostachy rosea</i>)
Lote 2	<i>C. elegans</i> + M9	<i>C. elegans</i> + sobrenadante del extracto del control negativo (medio líquido + ATZ)	<i>C. elegans</i> + Sobrenadante del extracto del ensayo (medio líquido + <i>Purpureocillium lilacinum</i> + ATZ)	<i>C. elegans</i> + Sobrenadante del extracto del ensayo control (medio líquido + <i>Purpureocillium lilacinum</i>)

Fuente: La autora

Por cada lote de hongo, los tratamientos se realizaron en triplicado, y cada uno de los triplicados (1, 2 y 3) fue analizado una vez como se muestra en el esquema 3, siendo que en la placa A se analizaron los bioensayos de sobrevivencia, desarrollo larval y número de huevos en el útero; en la placa B se analizaron los bioensayos de bombeos faríngeos y locomoción. La exposición fue realizada por experimentos de la siguiente manera:

Experimento 1: *primera semana*

- Control (C)
- Control Negativo (CN) Erlenmeyer 1
- Ensayo (E) Erlenmeyer 1
- Ensayo Control (EC) Erlenmeyer 1

Experimento 2: *segunda semana*

- Control (C)
- Control Negativo (CN) Erlenmeyer 2
- Ensayo (E) Erlenmeyer 2

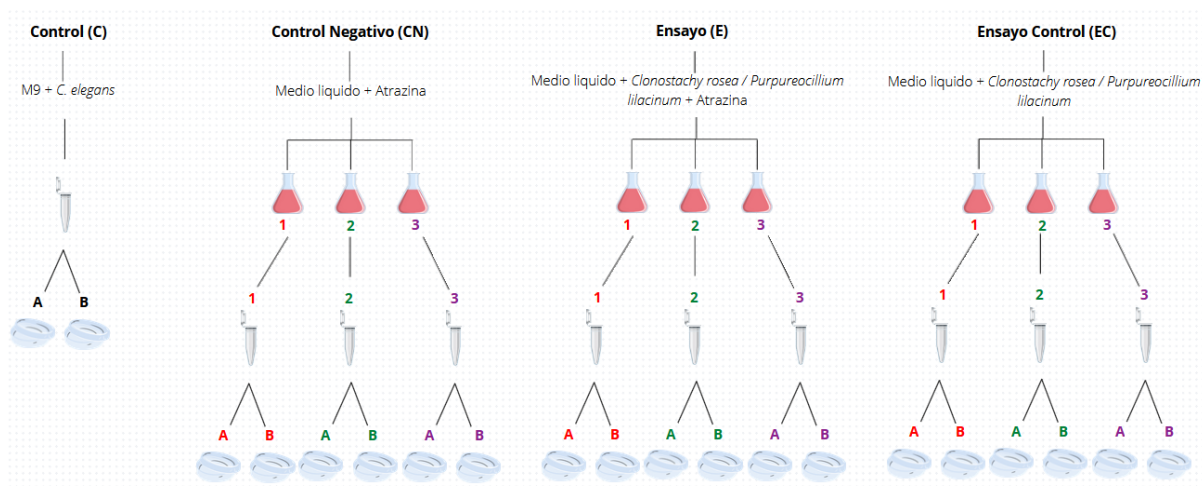
- Ensayo Control (EC) Erlenmeyer 2

Experimento 3: *tercera semana*

- Control (C)
- Control Negativo (CN) Erlenmeyer 3
- Ensayo (E) Erlenmeyer 3
- Ensayo Control (EC) Erlenmeyer 3

La exposición y el análisis de bioensayo se realizó un lote por vez.

Esquema 3. Representación gráfica de los triplicados que fueron hechos para cada uno de los tratamientos



El tratamiento Control (C) no es realizado en triplicado, este será realizado semanalmente. El lote 2 también tendrá el mismo procedimiento esquemático.

Fuente: La autora

4.7 BIOENSAYO

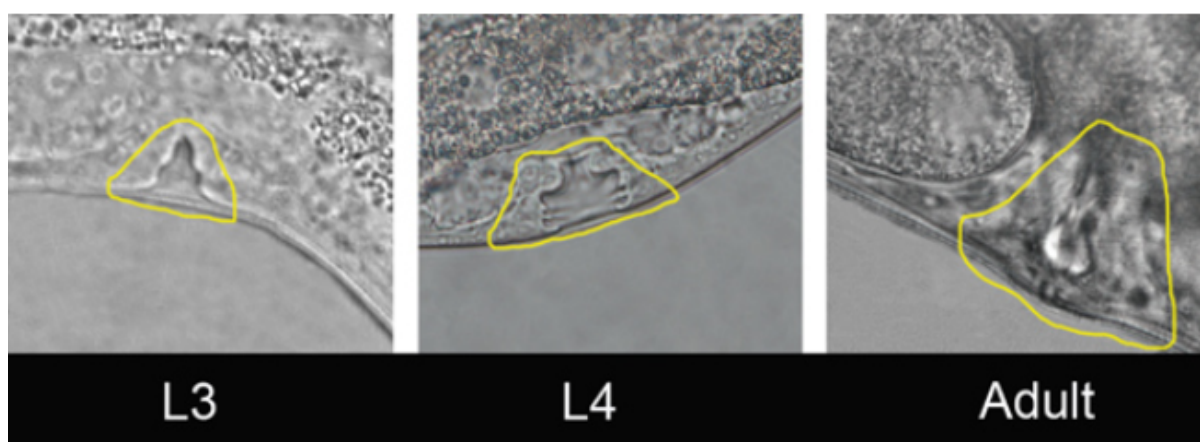
4.7.1 Ensayo de sobrevivencia

Los *C. elegans* se evaluaron 24 horas después de los tratamientos con los extractos metabolitos de la biodegradación fúngica. Fue realizado el conteo de los gusanos vivos y muertos, aquellos gusanos que emitan una respuesta a un estímulo mecánico, con un asa o alambre, se consideraron vivos; por otro lado, los gusanos que no emitían una respuesta se consideraron muertos (ARANTES *et al.*, 2016). Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada lote probado.

4.7.2 Ensayo en el desarrollo larval

Se evaluó la ocurrencia de las etapas larvales (L1, L2, L3, L4, adulto joven y adultos con huevos) a través de microscopio. Los gusanos que sobrevivan son analizados diariamente observando específicamente el desarrollo de la vulva (Figura 7) y la presencia de huevos en el útero (ARANTES *et al.*, 2016). Las características que fueron observadas son comparadas con la capacidad de desarrollo del control. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada lote probado.

Figura 7. Morfología de la vulva de *C. elegans* en L3, L4 y etapas adultas. El círculo amarillo indica una hendidura, que representa el útero.



Fuente: Porta-de-la-Riva *et al.* (2012).

4.7.3 Ensayo de locomoción

Los gusanos se lavaron con tampón M9, y dejados por 1 minuto para que se adapten; una gota de este líquido se transfirió a una lámina para la cuantificación del número *thrashes* en un microscopio, evaluando 10 gusanos en un intervalo de 20 segundos (NAWA *et al.*, 2012). El *thrashes* es el movimiento corporal completo hacia un lado y luego de regreso a la posición original. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada lote probado. Cada gusano 3 veces.

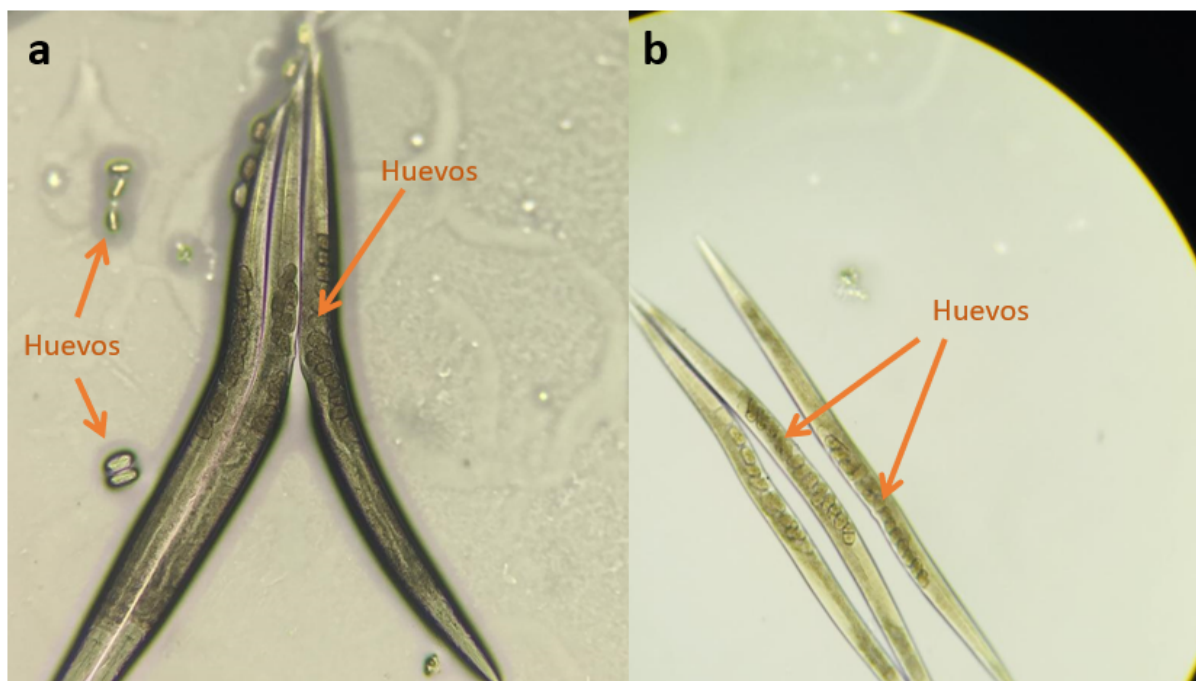
4.7.4 Ensayo de bombeos faríngeos

Se evaluaron 10 gusanos con ayuda de un microscopio observando y contando el número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos, en presencia de medio de cultivo NGM alimentadas con *E. coli* OP50 (ZHONG-QIN WU *et al.*, 2019). Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada lote probado. Cada gusano 3 veces.

4.7.5 Ensayo de número de huevos en el útero

Se examinaron y contabilizaron la cantidad de huevos presentes en el útero de 10 gusanos adultos para determinar si los metabolizados causan algún efecto en la reproducción de los *C. elegans*. Después de 48 horas de exposición en L1, los gusanos adultos fueron trasladados a placas de Petri, y expuestos a dos gotas de la solución *bleaching* hasta observar la expulsión de los huevos con ayuda del microscopio y pasando al conteo de los mismos (Figura 8). Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada lote probado.

Figura 8. *C. elegans* adultos con huevos en el útero. a) *C. elegans* en placas con medio NGM y *E. coli*, vistos en microscopia óptica en aumento 10x. b) *C. elegans* después de expuestos a solución *bleaching*, vistos en microscopia óptica en aumento 10x.



Fuente: La autora

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Past 4.03 para Windows y Microsoft Excel. Se utilizó ANOVA unidireccional o bidireccional para pruebas paramétricas y PERMANOVA unidireccional o bidireccional para pruebas no paramétricas seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar grupos. La significación estadística se fijará en $p < 0,05$.

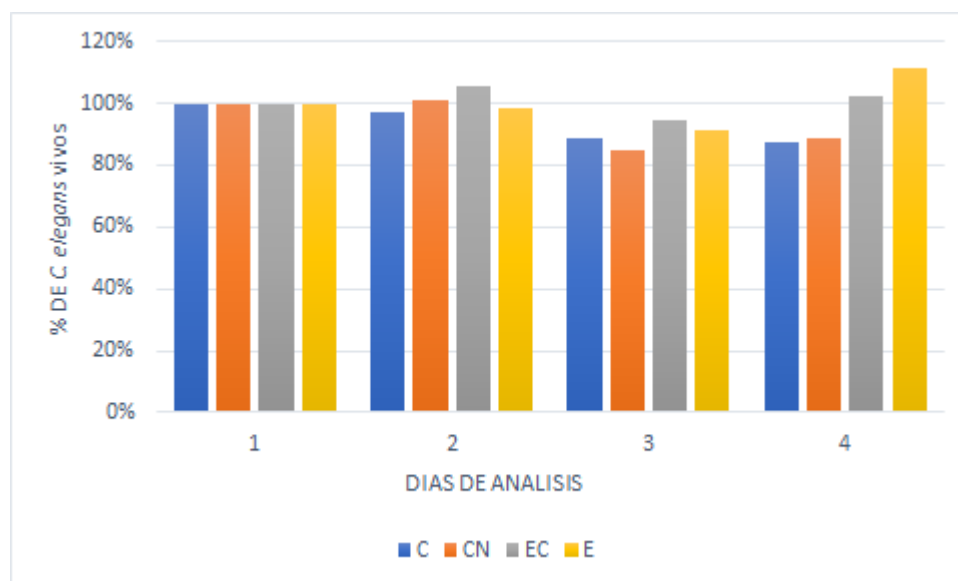
5 RESULTADOS

5.1 *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018

5.1.1 Ensayo de sobrevivencia

El ensayo para evaluar la supervivencia de *C. elegans* a partir del cultivo con el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 se analizó durante cuatro días consecutivos divididos en tres experimentos que corresponden al promedio de las pruebas presentadas en el gráfico 1. Los datos se analizaron utilizando el modelo Two-way Permanova ya que no presentaban normalidad. Según el análisis, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (valor de $p > 0,05$). Sin embargo, hubo una ligera caída en la supervivencia de *C. elegans* al tercer día de análisis del tratamiento (CN, EC y E).

Gráfico 1. Número de *C. elegans* vivos en % de sobrevivencia para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC)



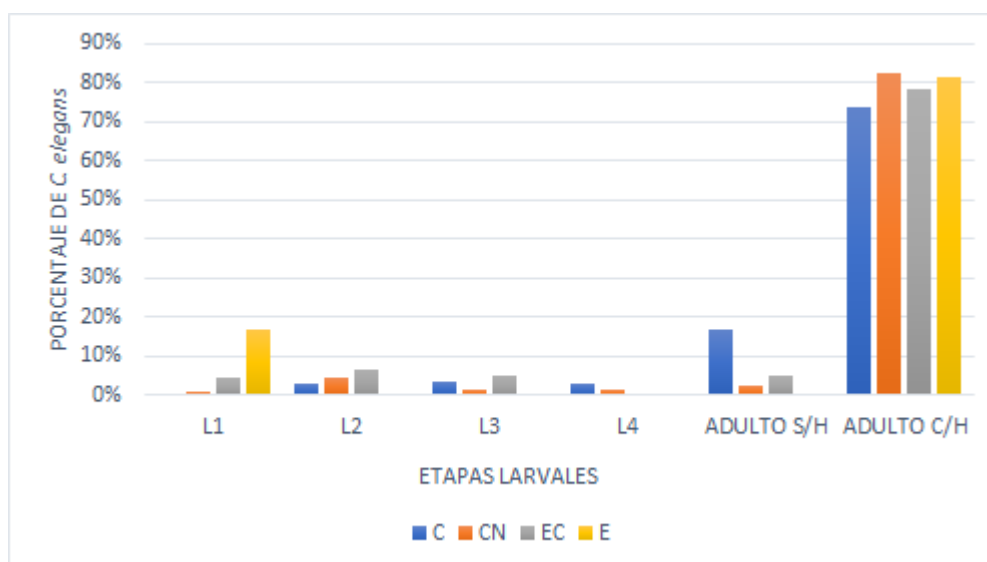
5.1.2 Ensayo en el desarrollo larval

Para evaluar el desarrollo larval de *C. elegans*, se contaron individuos durante cuatro días, esperándose los siguientes estadios: L1 (Día 1), L2 y L3 (Día 2), L4 (Día 3 por la mañana), adulto joven (Día 3 de la tarde) y adultos con niños (Día 4), apéndice 9. De acuerdo con el análisis de variación no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (p-valor

> 0,05). No obstante, el análisis estadístico confirmó que hay diferencias entre los días que corresponden a sus respectivas etapas larvales (L1, L2, L3, L4, adulto joven y adultos con huevos), confirmando la diferencia en el desarrollo durante el ciclo de vida.

En resumen, los datos fueron convertidos a porcentajes y el gráfico 2 corresponde al análisis del último día de cada uno de los tres experimentos, donde la mayoría o la totalidad de *C. elegans* se encuentran en estado larvario adulto con huevos. Sin embargo, según el gráfico, aunque no hay diferencia significativa, se puede observar que hay individuos en estadio L1 en el tratamiento con el hongo y la atrazina (E). Durante el análisis de ese día se observó la presencia de muchos huevos ovipositados y listos para eclosionar.

Gráfico 2. Promedio de ocurrencia (%) de las etapas larvales (L1, L2, L3, L4), adulto joven y adultos con huevos) para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 en el cuarto día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).

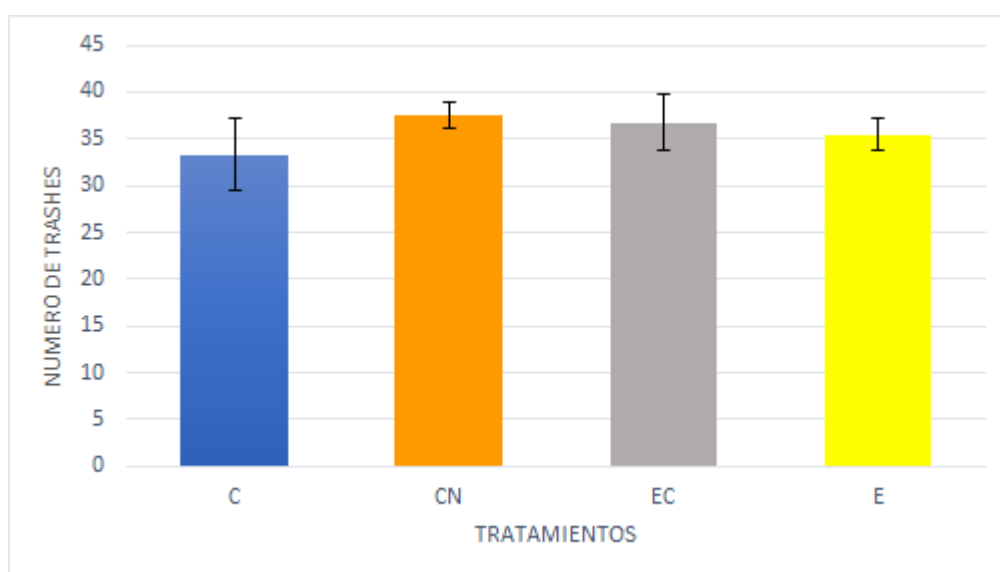


5.1.3 Ensayo de locomoción

Se evaluó el ensayo de locomoción del número de *thrashes* en individuos adultos sin huevos (tercer día). El promedio de los tratamientos corresponde al número de *thrashes* de 10 individuos evaluados por triplicado realizados en los tres tiempos de experimentos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (p-valor >0.05) lo que indica que el número de *thrashes* no fue afectado por el ensayo fúngico (E), ni por la presencia de atrazina (CN), ni por el hongo (EC).

El promedio general del número de *thrashes* en los datos obtenidos de los 10 individuos analizados se presenta en el gráfico 3 que corresponde al análisis del tercer día de 10 individuos en 20 segundos evaluados en triplicado. En este análisis, de acuerdo con el gráfico 3, por más de que no haya diferencias significativas entre los tratamientos es posible observar que en los tres tratamientos (CN, EC y E) hubo un aumento mínimo en el número de *thrashes* en los *C. elegans*.

Gráfico 3. Promedio general número de *thrashes* en un intervalo de 20 seg para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 en el tercer día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).



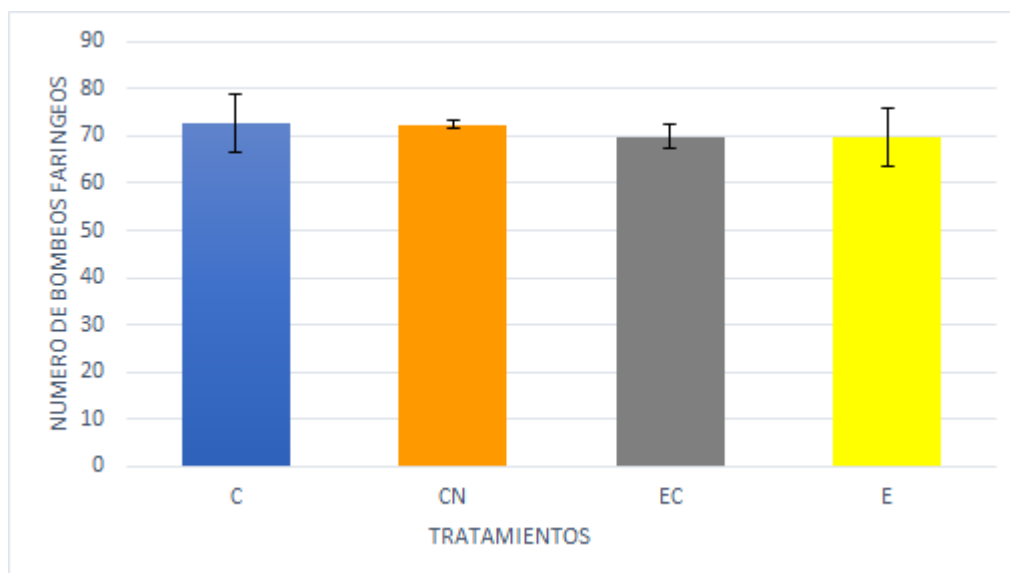
5.1.4 Ensayo de bombeos faríngeos

Para el ensayo de bombeos faríngeos fueron evaluados los individuos adultos sin huevos (tercer día). La media de los tratamientos corresponde al número de bombeos faríngeos en 20 segundos de 10 individuos evaluados en triplicado, esto en los días correspondientes de los tres experimentos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (p -valor $>0,05$) señalando que el número de bombeos faríngeos no fue afectada por la presencia de atrazina (CN), por la presencia del hongo solo (EC), y tampoco por el hongo en presencia del hongo (E).

Los datos de la media general de número de bombeos faríngeos adquirida de los 10 individuos analizados en el gráfico 4 corresponden al análisis del tercer día de cada uno de los experimentos analizados, no obstante, de acuerdo con el gráfico 4 en los tres tratamientos

(CN, EC y E) hubo una mínima diferencia en la disminución de bombeo faríngeo en los *C. elegans* en comparación con el control.

Gráfico 4. Promedio general del número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 seg para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 en el tercer día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).

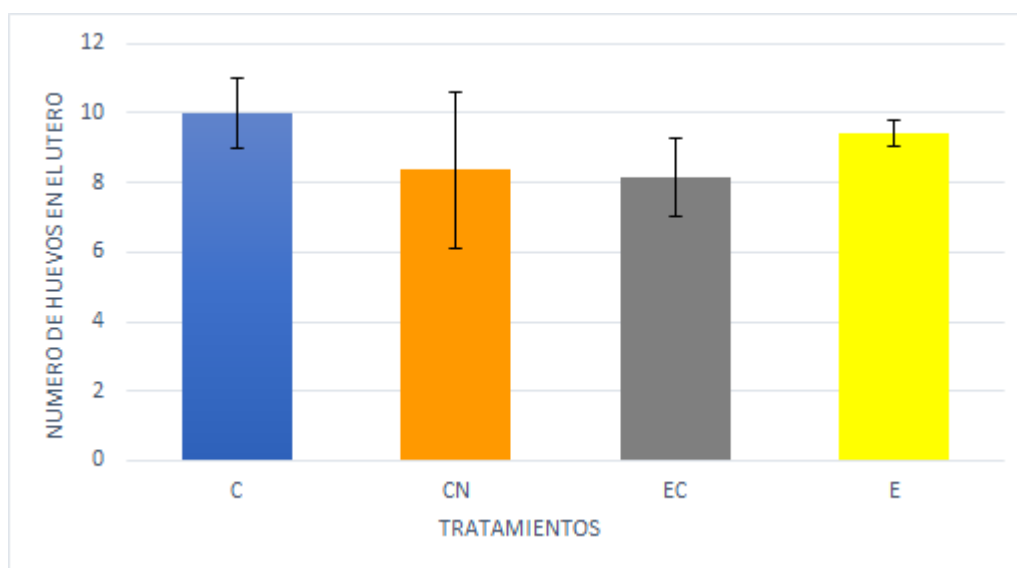


5.1.5 Número de huevos en el útero

El ensayo de número de huevos en el útero fue evaluado en individuos adultos con huevos (cuarto día). La media de los tratamientos corresponde al número de huevos en el útero de 10 individuos realizados en los días correspondientes de análisis de los tres experimentos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (p -valor $> 0,05$) mostrando que el número de huevos en el útero no fue perjudicado por la presencia de atrazina (CN), por la presencia del hongo solo (EC), y tampoco por el hongo en presencia del hongo (E).

En resumen, la media general del número de huevos en el útero en el gráfico 5, corresponde al análisis del cuarto día de cada uno de los experimentos analizados. A pesar de que no hubo significancia, es observado en el gráfico que los tratamientos en presencia de atrazina (CN) y en presencia del hongo (EC) afectan negativamente la cantidad de huevos en el útero de los *C. elegans*.

Gráfico 5. Promedio general del número de huevos presentes en el útero de los *C. elegans* adultos para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018 en el último día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).

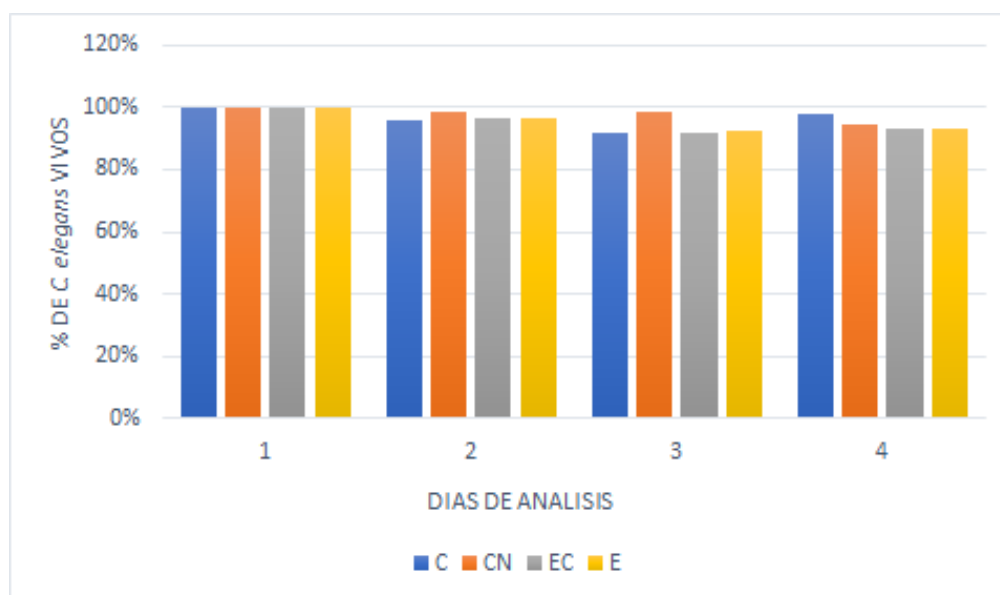


5.2 *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014

5.2.1 Ensayo de sobrevivencia

El ensayo para evaluar la supervivencia de *C. elegans* del cultivo con el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 se analizó durante cuatro días consecutivos divididos en tres experimentos que corresponden al promedio de las pruebas presentadas en el gráfico 6. Los datos se analizaron utilizando el modelo Two-way Permanova ya que no presentaban normalidad. Según el análisis, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (valor de $p > 0,05$).

Gráfico 6. Promedio del número de *C. elegans* vivos en % de sobrevivencia para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).

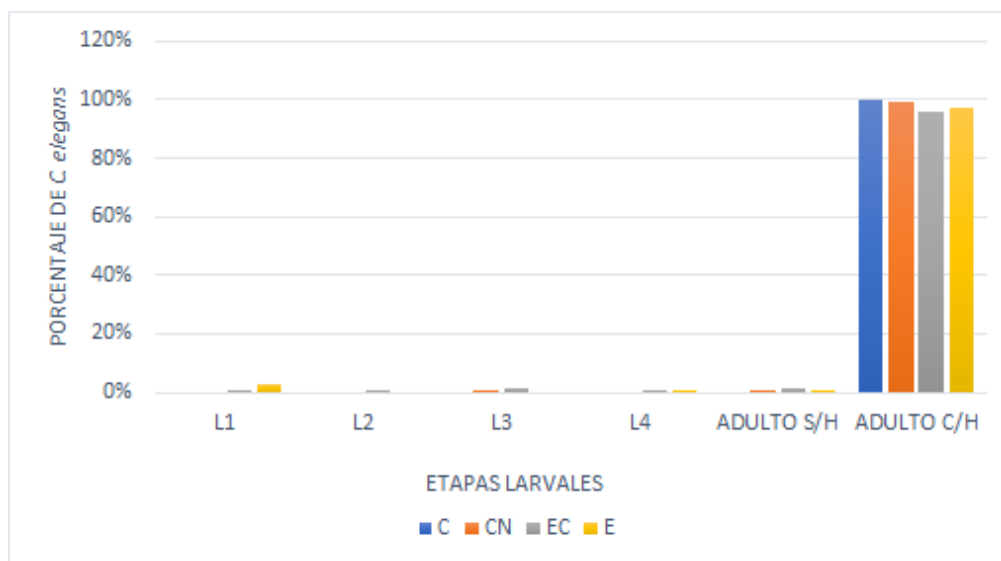


5.2.2 Ensayo en el desarrollo larval

La evaluación del desarrollo larval de los *C. elegans* fue realizando el conteo de individuos durante cuatro días, previendo las siguientes etapas: L1 (Día 1), L2 y L3 (Día 2), L4 (Día 3 por la mañana), adulto joven (Día 3 por la tarde) y adultos con niños (Día 4), apéndice 7. De acuerdo con el análisis de variabilidad no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (p -valor $> 0,05$), sin embargo, el análisis estadístico confirmó que hay diferencias entre los días que corresponden a sus respectivas etapas larvales (L1, L2, L3, L4, adulto joven y adultos con huevos), como identificado para *C. rosea* CCMIBA_R018.

Los datos fueron convertidos en porcentajes y el gráfico 7 representa la media del análisis del último día de cada uno de los tratamientos de los tres experimentos.

Gráfico 7. Ocurrencia de las etapas larvales (L1, L2, L3, L4, adulto joven y adultos con huevos) para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 en el cuarto día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC)

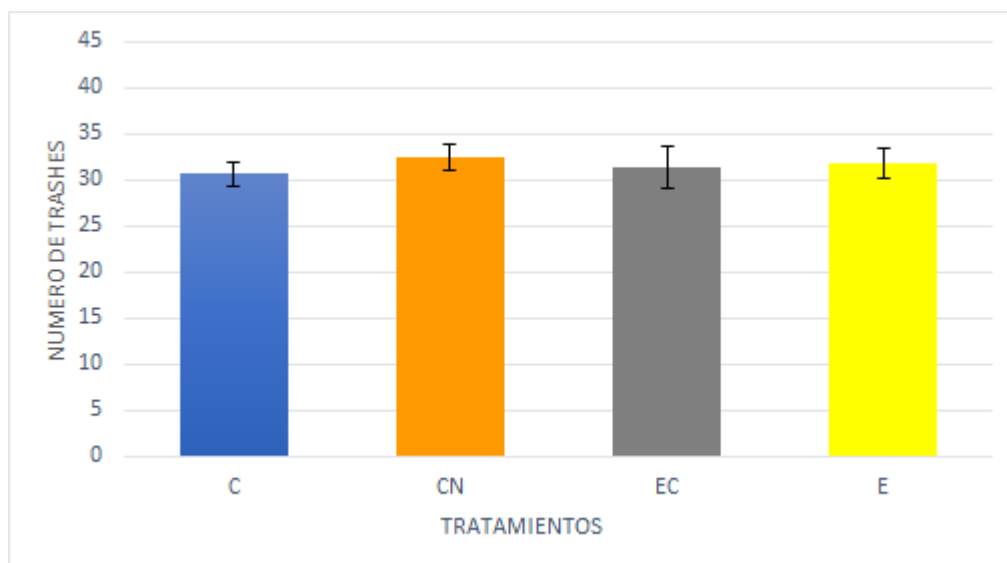


5.2.3 Ensayo de locomoción

En el ensayo de locomoción se evaluó el número de *thrashes* en individuos adultos sin huevos (tercer día). El promedio de los tratamientos corresponde al número de *thrashes* de 10 individuos evaluados por triplicado realizados en los tres tiempos de experimentos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p\text{-value} > 0.05$) lo que indica que el número de *thrashes* no fue afectado por el ensayo fúngico (E), ni por la presencia de atrazina (CN), ni por el hongo (EC).

Fue obtenida la media general del número de *thrashes* en los datos obtenidos de los 10 individuos analizados y el gráfico 3 corresponde al análisis del tercer día de cada uno de los experimentos. De acuerdo con el gráfico, las diferencias no significativas entre los tratamientos es posible ser observada en los tres tratamientos (CN, EC y E) ya que hubo un pequeño incremento en el número de *thrashes* en los *C. elegans* comparadas con el tratamiento control.

Gráfico 8. Promedio general del número de *thrashes* en un intervalo de 20 seg. para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 en el tercer día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).

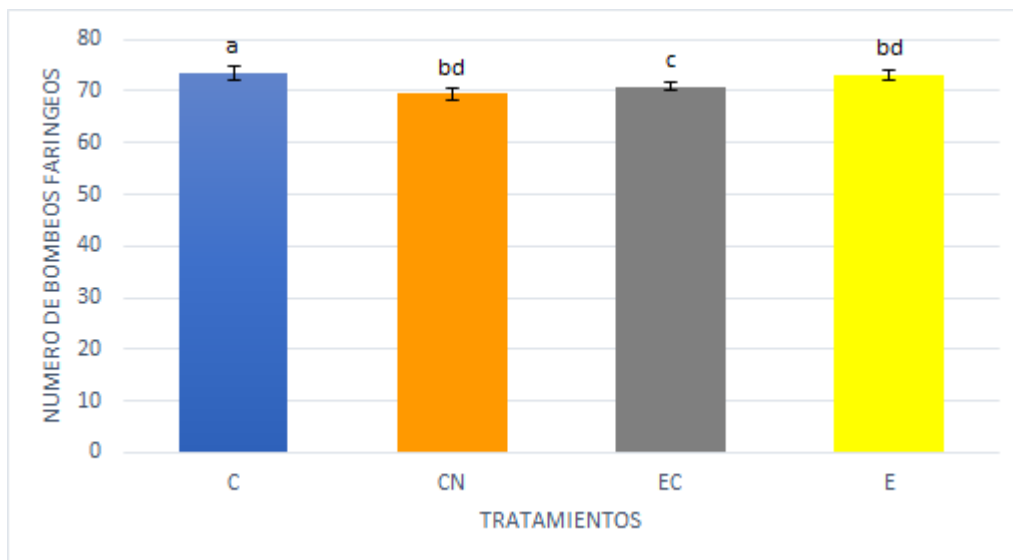


5.2.4 Ensayo de bombeos faríngeos

Para el ensayo de bombeos faríngeos fue evaluado los individuos adultos sin huevos (día 3). La media de los tratamientos corresponde al número de bombeos faríngeos en 20 segundos de 10 individuos evaluados en triplicado, esto en los días correspondientes de los tres experimentos. Si hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p\text{-valor} < 0,05$) estando exactamente entre los tratamientos C-CN y CN-E señalando que el número de bombeos faríngeos de los *C. elegans* fue afectado por la presencia de atrazina (CN) y también por el hongo en presencia de atrazina (E).

Los datos de la media general de número de bombeos faríngeos obtenida de los 10 individuos analizados y el gráfico 9 corresponde al análisis del tercer día de cada uno de los experimentos analizados. Se observó, que el número de bombeos faríngeos de los *C. elegans* fueron de 73 y 69 en los tratamientos C y CN, respectivamente, disminuyendo su número concordando con la toxicidad de la atrazina. Por otro lado, el número de bombeos faríngeos entre los tratamientos CN y E fueron de 69 y 73, respectivamente, aumentando su número de bombeos lo que quiere decir que hubo se mantuvo en el número de bombeos faríngeos indicando que la toxicidad de la atrazina disminuyó, después de cultivar el hongo en la solución, concordando con la diferencia significativa.

Gráfico 9. Promedio general del número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 seg para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 en el tercer día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC). $p < 0,05$ diferencia significativa en los tratamientos Control Negativo (CN) y Ensayo (E).

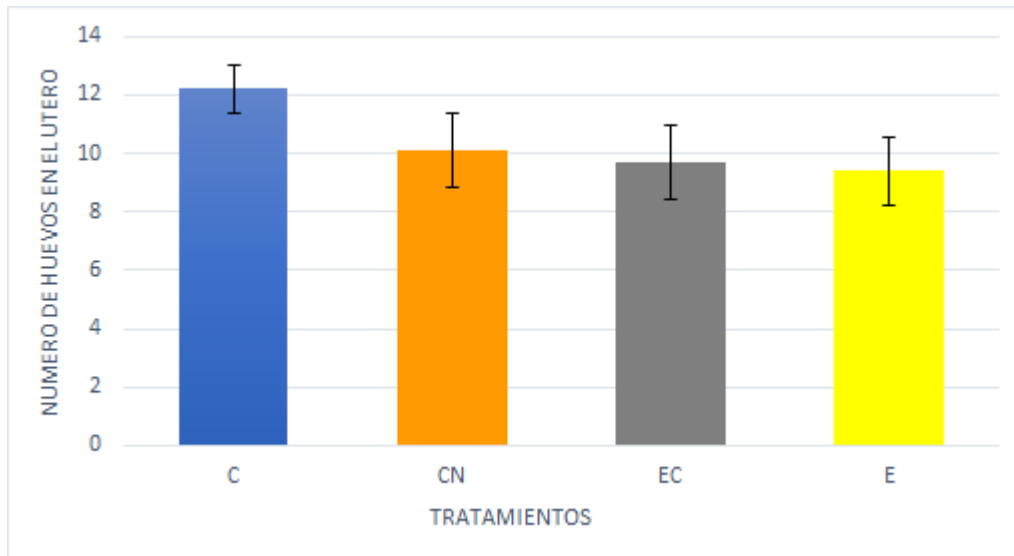


5.2.5 Número de huevos en el útero

El ensayo de número de huevos en el útero fue evaluado en los individuos adultos con huevos (cuarto día). La media de los tratamientos corresponde al número de huevos en el útero de 10 individuos realizados en los días correspondientes de análisis de los tres experimentos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (p -valor $> 0,05$) mostrando que el número de huevos en el útero no fue perjudicado por la presencia de atrazina (CN), por la presencia del hongo solo (EC), y tampoco por el hongo en presencia del hongo (E).

En resumen, la media general del número de huevos en el útero y el gráfico 10, corresponde al análisis del cuarto día de cada uno de los experimentos analizados. A pesar de que no hubo diferencia significativa, es observado en el gráfico que los tratamientos en presencia de atrazina (CN) y en presencia del hongo (EC) si afectan, disminuyendo la cantidad de huevos en el útero de los *C. elegans*.

Gráfico 10. Promedio general del número de huevos presentes en el útero de los *C. elegans* adultos para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014 en el cuarto día de análisis. Control (C); Control Negativo (CN); Ensayo (E); y Ensayo Control (EC).



6 DISCUSIÓN

El número de bombeos faríngeos en los ensayos del *P. lilacinum* CCMIBA_R014, fue el único que mostró una diferencia significativa para en el tratamiento CN y tratamiento E. La exposición a la ATZ y situaciones asociadas al estrés oxidativo pueden llevar a disturbios neurológicos, siendo que la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) sea útil para monitorear los efectos asociados a los compuestos neurotóxicos (BOILY *et al.*, 2013). La ATZ ejerce toxicidad inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, que actúa en la fenda sináptica y en las uniones neuromusculares, causando la quiebra de la Acetilcolina (ACh), un neurotransmisor esencial en el sistema nervioso central (SNC) de humanos, como de roedores e insectos; e inhibidores competitivos de la AChE interrumpen la fisiología de los ganglios asimismo las uniones efectoras neuromusculares controladas por la ACh (MLADENOVIC *et al.*, 2018). Esta inhibición de la AChE trae como consecuencia la acumulación de neurotransmisores y subsecuentemente interferencia con la vía colinérgica, causando una hiperestimulación muscular y disturbios en el movimiento (AGUIAR *et al.*, 2016).

Los resultados que se obtuvieron en este ensayo mostraron una disminución en el bombeo faríngeo para el tratamiento CN. Siendo inesperado, ya que según la literatura se esperaría una hiperestimulación muscular, posiblemente este resultado obtenido se deba a que la inhibición de la AChE por la ATZ es dependiente de la dosis, donde dosis mayores que 0,5 µg/mL de ATZ no ejercen ningún efecto sobre la inhibición de la AChE (MLADENOVIC *et al.*, 2018). Probablemente, la disminución en el bombeo faríngeo, se deba a que el aumento en la actividad de la AChE pueda llevar a la disminución de la concentración de la ACh interfiriendo en la vía colinérgica en el sentido a disminuir la estimulación muscular (TAVARES, 2019).

Por otro lado, incluso los metabolitos secundarios producidos por el hongo *P. lilacinum* muestran una alteración en el bombeo faríngeo de los *C. elegans* como es relatado en Khan *et al.* (2004), como se evidencia en el gráfico 10. Sin embargo, cuando es observado el resultado en el tratamiento E, el bombeo faríngeo del nematoide se incrementó llegando a ser similar al tratamiento C, sugiriendo que la toxicidad de la atrazina pudo haber disminuido al ser transformada por el hongo *P. lilacinum*, indicando que la biotransformación de la molécula causa un aumento del número de bombeos faríngeos, posiblemente inhibiendo la AChE resultando en una acumulación de neurotransmisores provocando una hiperestimulación muscular de la faringe.

Los resultados observados en el número de huevos en el útero disminuyeron para los tratamientos CN y EC, utilizando el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 en el primer ensayo y el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 para el segundo ensayo, evidenciando la alteración que causa la ATZ en los nematoides y los metabolitos secundarios sobre la reproducción de los *C. elegans*. En cuanto a la ATZ, este actúa como disruptor endocrino (DE) causando alteraciones en la señalización hormonal de la GnRH a la hipófisis provocando la pérdida de la función reproductiva. Estos DEs también están relacionados al actuar sobre las enzimas involucradas en la esteroidogénesis y el metabolismo de las hormonas, interferencia de la señalización de las hormonas tiroideas (HT) y las hormonas estimulantes de la tiroides (TSH), interferencia con la unión de hormonas al receptor correspondiente, particularmente el receptor de andrógenos (RA) o el receptor de estrógenos (RE); por medio de tres mecanismos fundamentales: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción, aumentando o disminuyendo sus niveles (TABARES & MORDECAY, 2020). Por otro lado, en varios estudios como el de Menzel *et al.* (2005) fue encontrado que la atrazina inhibe la reproducción en *C. elegans* de manera dependiente de la concentración con un valor de CE50 de 86,64 mg/L. La atrazina puede producir neurotoxicidad dopaminérgica y daño oxidativo en mamíferos (ZHANG *et al.*, 2011). En cuanto a los metabolitos secundarios, es relatado en el estudio de Sun *et al.* (2020) que metabolitos secundarios como antibióticos y toxinas influyen en el crecimiento y el desarrollo contra *C. elegans* y *Panagrellus redivivus*.

Sin embargo, al ser transformada la atrazina por el hongo *C. rosea*, tratamiento E, se pudo percibir una disminución en la toxicidad de la molécula de atrazina causando un aumento en el número de huevos en el útero; aun así, estadísticamente no hubo diferencia. Por el contrario, los metabolitos secundarios producidos por el hongo *P. lilacinum* ejercen un efecto tóxico un poco mayor al disminuir el número en el útero de los *C. elegans*, corroborando la toxicidad que ejercen los metabolitos secundarios en la reproducción, locomoción y alimentación como es mencionado por Aguilar (2021). Por otro lado, el resultado en la transformación de la atrazina usando el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 fue diferente, ya que la biotransformación de la molécula aumentó su toxicidad afectando aún más el número de huevos en el útero.

7 CONCLUSIÓN

Es de destacar que el número de bombeos faríngeos, único efecto significativo, en los ensayos con el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 aumentó en relación al CN demostrando que los metabolitos secundarios son menos tóxicos y que la degradación de la atrazina cuando es transformada deja la molécula menos tóxica. Caso contrario con los ensayos realizado con el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 ya que la degradación de la atrazina con el hongo dejó la molécula con una toxicidad mayor.

Pese a que en los ensayos de número de huevos en el útero de los *C. elegans* para los ensayos con el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014 y el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018, no hubo un efecto significativo, es posible observar una alteración cuyo efecto está relacionado a los metabolitos secundarios producidos por los hongos como también solo a la ATZ. Sin embargo, al ser transformada la molécula de la ATZ por la degradación con el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 esta disminuye su efecto tóxico.

Los ensayos con el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 demostraron mayor varianza en la sobrevivencia de los *C. elegans* indicando una mayor toxicidad que en los ensayos realizado con el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014, cuyo comportamiento puede estar influenciado por los metabolitos secundarios. Sin embargo, con los resultados obtenidos de los ensayos E con cada uno de los hongos, se cree que la degradación de la atrazina disminuyó en su toxicidad cuando esta fue realizada por el hongo *C. rosea* CCMIBA_R018 para algunos parámetros analizados, mientras para otros parámetros cuando la degradación fue realizada por el hongo *P. lilacinum* CCMIBA_R014. Para ambos hongos se realizaron pruebas de que su toxicidad en los controles era mayor o igual a la atrazina sin degradar.

Sin embargo, con base en este trabajo y en estos datos, es insuficiente por sí solo para confirmar el potencial de degradación, debido a que el efecto observado no fue en todos los parámetros analizados, resultando en la ausencia de significancia estadística entre los análisis. Se cree que la concentración de la atrazina que se usó no fue lo suficiente para evidenciar diferencias entre los tratamientos. Por lo tanto, se concluye que la concentración de 10 mg/L de atrazina no fue suficiente para causar un efecto tóxico en *C. elegans* y que se deben realizar nuevos ensayos a concentraciones mayores

8 REFERENCIAS

AGUIAR, L. M. de.; FIGUEIRA, F. H.; GOTTSCHALK, M. S.; ROSA, C. E. da. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 185, p. 94-101, Mar 2016.

AGUILAR, J. F. S. *P. lilacinum* opción biorracional para el control de nematodos. **Agro Excelencia**, n. 42, p. 22-24, 2021.

AKHTAR, N.; MANNAN, M. A. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. **Biotechnology Reports**, v. 26, Jun 2020.

ANDRETTA, A. **Análise da fitotoxicidade da atrazina após biodegradação fúngica**. 2022. Trabajo de Conclusión de Curso - TCC (Bacharelado en Biotecnología) - Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do iguacu-PR.

ARANTES, L. P.; PERES, T. V.; CHEN, P.; CAITO, S.; ASCHNER, M.; SOARES, F. F. A. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Research**, v. 5, n. 6, p. 1629-1638, Nov 2016.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of Creosote-Contaminated Soil: A Laboratory Scale Bioremediation Study Using Indigenous Soil Fungi. **Water Air and Soil Pollution**, v. 172, n. 1, p. 201-219, May 2006.

BELFROID, A. C.; DRUNEN, M. van; BEEK, M. A.; SCHRAP, S. M.; GESTEL, C. A. van; HATTUM, B. van. Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. **The Science of the Total Environment**, v. 222, n. 3, p. 167-83, Oct 1998.

BENIAN, G. M.; EPSTEIN, H. F. *Caenorhabditis elegans* Muscle A Genetic and Molecular Model for Protein Interactions in the Heart. **Circulation Research**, v. 109, n. 9, p. 1082-1095, Oct 2011.

BENGUENAB, A.; CHIBANI, A. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by filamentous fungi (*Aspergillus ustus* and *Purpureocillium lilacinum*) isolated from used engine oil contaminated soil. **Acta Ecológica Sinica**, v. 41, n. 5, p. 416-423, Oct 2021.

BLAHOVA, J.; PLHALOVA, L.; SVOBODOVA, Z.; COCILOVO, C.; FAGGIO, C. Embryotoxicity of atrazine and its degradation products to early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 77, Jul 2020.

BOILY, M.; SARRASIN, B.; DEBLOIS, C.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 20, n. 8, p. 5603-5614, Ago 2013.

BONASSA, G. **Seleção de fungos para desenvolvimento de bioinoculante para biorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina**. 2019. Trabajo de Conclusión de Curso (Bacharel en Biotecnología) - Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do iguaçu - PR.

CALVOPÍÑA, M. D. A.; MAYA, M. J. M.; PARRA, G. A. R. Contaminantes emergentes en aguas y remediación de suelos con nanopartículas. **Alianzas y Tendencias BUAP**, v. 6, n. 24, p. 50-74, Sep 2021.

CAMPOS, M. A. R. EL USO DE PESTICIDAS EN LA AGRICULTURA Y SU DESORDEN AMBIENTAL. **Revista “Enfermería a la Vanguardia”**, v. 6, n. 2, p. 40-47, Jul 2018.

CAPPOANI, C. **Degradação da atrazina por processos oxidativos avançados na presença de ozônio**. 2020. Trabajo de Conclusión de Curso (Bacharelado en Química) - Departamento de Química, Universidad Tecnológica Federal del Paraná, Pato Branco - PR.

CARVALHO, Fernando P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 2017.

CHAGAS JR., A. F.; MARTINS, A. L. L.; OLIVEIRA, R. S. de; SOUZA, M. C.; GOMES, F. L.; CHAGAS, L. F. B. Agronomic efficiency of soybean inoculated with *Trichoderma* and *Purpureocillium* in cerrado conditions, Tocantins, Brazil. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 319-325, Oct 2020.

CHÁVEZ, G.; ESTRADA, N.; GÓMEZ, J.; CHOQUE, R.; CRESPO, C.; ALVAREZ, M. T. Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Primera parte: Uso de hongos en biorremediación. **Revista Con-Ciencia**, v. 1, n. 1, p. 85-92, Oct. 2013.

CLAVIJO, A.; KRONBERG, M. F.; ROSSEN, A.; MOYA, A.; CALVO, D.; SALATINO, S. E.; PAGANO, E. A.; MORÁBITO, J. A.; MUNARRIZ, E. R. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 252-261, Nov 2016.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, Jun 2015.

DIMOV, I.; MADURO, M. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 383-396, Sep 2019.

DOMÉNECH, J. Plaguicidas: sus efectos en la salud humana. **Offarm**, v. 23, n. 7, p. 108-114, Jul 2004.

EMMONS, S. W. The development of sexual dimorphism: studies of the *Caenorhabditis elegans* male. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 3, n. 4, p. 239-262, 2014.

FERNANDES, A. F. T.; MORETTO, J. A. S.; CAMPANHARO, S. C.; STEHLING, E. G.; WANG, P.; STALEY, C.; SADOWSKY, M. J.; ALTARUGIO, L. M. Impact of Atrazine Exposure on the Microbial Community Structure in a Brazilian Tropical Latosol Soil. **Microbes and Environments**, v. 35, n. 2, Abr 2020.

FORADORI, C. D.; ZIMMERMAN, A. D.; HINDS, L. R.; ZULOAGA, K. L.; BRECKENRIDGE, C. B.; HANDA, R. J. Atrazine Inhibits Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Release Without Altering GnRH Messenger RNA or Protein Levels in the Female Rat. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 1, Ene 2013

FOUAD, M. R.; SHAMSAN, A. Q. S.; ABDEL-RAHEEM, S. A. A. Toxicity of atrazine and metribuzin herbicides on earthworms (*Aporrectodea caliginosa*) by filter paper contact and soil mixing techniques. **Current Chemistry Letters**, v. 12, n. 1, p. 185-192, 2023.

FROTA, M. T. B. A.; SIQUEIRA, C. E. Agrotóxicos: os venenos ocultos na nossa mesa. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, Feb 2021.

GALIMOV, E. R.; GEMS, D. Shorter life and reduced fecundity can increase colony fitness in virtual *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 19, n. 5, May 2020.

GARCETE, L. A. A. **Evaluación del efecto protector de la Rutina frente a los efectos tóxicos inducidos por atrazina en *Caenorhabditis elegans***. 2022. Trabajo de Conclusión de Curso - TCC (Bacharelado en Biotecnología) - Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza, Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do iguacu-PR.

GARCÍA-ESPIÑEIRA, M.; TEJEDA-BENITEZ, L.; OLIVERO-VERBEL, J. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 216-222, Jul 2018.

HAN, P.; ZHANG, X.; XU, D.; ZHANG, B.; LAI, D.; ZHOU, L. Metabolites from *Clonostachys* Fungi and Their Biological Activities. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, Oct 2020.

HE, H.; LIU, Y.; YOU, S.; LIU, J.; XIAO, H.; TU, Z. A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 24, Dec 2019.

HENN, C.; MONTEIRO, D. A.; BOSCOLO, M.; SILVA, R da.; GOMES, E. Biodegradation of atrazine and ligninolytic enzyme production by basidiomycete strains. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 266, Ago 2020.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, Ene 2017.

ILLERA, P. A. ***Caenorhabditis elegans*: señalización de Ca²⁺ en la faringe**. 2016. Disertación (Maestría en Investigación Biomédica) - Instituto de Biología y Genética Molecular, Universidad de Valladolid y CSIC, Valladolid- España.

JACQUES, M. T.; ÁVILA, D. S.; OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; FRACETO, L. F. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 245-253, May 2017.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346-352, 2004.

KIM, S. H.; FAN, M.; PRASHER, S. O.; PATEL, R. M.; HUSSAIN, S. A. Fate and transport of atrazine in a sandy soil in the presence of antibiotics in poultry manures. **Agricultural Water Management**, v. 98, n. 4, p. 653-660, Feb 2011.

KOLEKAR, P. D.; PHUGARE, S.; JADHAV, J. P. Biodegradation of atrazine by *Rhodococcus* sp. BCH2 to N-isopropylammelide with subsequent assessment of toxicity of biodegraded metabolites. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 3, p. 2334-2345, Feb 2014.

KORMISH, J. D.; GAUDET, J.; MCGHEE, J. D. Development of the *C. elegans* digestive tract. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 20, n. 4, p. 346-54, Ago 2010.

LECROISEY, C.; SÉGALAT, L., GISELER, K. The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 28, n. 1, p. 79-87, May 2007.

LEUNG, M. C. K.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; HELMCKE, K. J.; ASCHNER, M.; MEYER, J. N. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 5-28, Jun 2008.

LI, C.; KIM, K. **Wormbook: The Online Review of *C. elegans* Biology**, disponible en: <http://www.wormbook.org/>. Acceso en: Dic. 2022.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, Jun 2018.

LÓPEZ-MEDRANO, R.; MADERA, A. P.; FOZ, C. F. Infecciones oculares por *Purpureocillium lilacinum*: presentación de un caso y revisión de la literatura. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 2, p. 111-114, Jun 2015.

MASAPHY, S.; LEVANON, D.; VAYA, J.; HENIS, Y. Isolation and Characterization of a Novel Atrazine Metabolite Produced by the Fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-Chloro-4-Ethylamino-6-(1-Hydroxyisopropyl)Amino-1,3,5-Triazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4342-4346, Dec 1993.

MATIAS, T. P.; BRAGA, J. K.; DAMASCENO, L. H. S.; BRUCHA, G. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, Jul 2021.

MEDRADES, J. P. C. *elegans* como organismo modelo. **Revista Blog do Profissão Biotec**, v. 10, Jul 2023.

MENZEL, R.; RODEL, M.; KULAS, J.; STEINBERG, C. E. W. CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 438, n. 1, p. 93-102, Jun 2005.

MEYER, B. J. Sex Determination and X Chromosome Dosage Compensation. In: RIDDLE, D. L., BLUMENTHAL, T., MEYER, B. J., PRIESS, J. R. **C. elegans II**. Ed. 2. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

MLADENOVIĆ, M.; ARSIĆ, B. B.; STANKOVIĆ, N.; MIHOVIĆ, N.; RAGNO, R.; REGAN, A.; MILIĆEVIĆ, J. S.; TRTIĆ-PETROVIĆ, T. M.; MICIĆ, R. The targeted pesticides as acetylcholinesterase inhibitors: comprehensive cross-organism molecular modelling studies performed to anticipate the pharmacology of harmfulness to humans In Vitro. **Molecules**, v. 23, n. 9, Ago 2018.

MONTT, J. F de la. P. **Bioensayos con embriones de pez cebra (*Danio rerio*) como herramientas para la determinación de las condiciones toxicológicas de cuerpos de agua y mecanismos de inhibición de la eclosión**. 2012. Tesis de maestría (Maestría en Ciencias Biológicas) - Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Chile.

NAWA, M.; MATSUOKA, M. The Method of the Body Bending Assay Using *Caenorhabditis elegans*. **Bio-protocol**, v. 2, n. 17, Sep 2012.

NGUYEN, L. N.; HAI, F. I.; YANG, S.; KANG, J.; LEUSCH, F. D. L.; RODDICK, F.; PRICE, W. E.; NGHIEM, L. D. Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters, industrial chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: Role of biosorption and biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 88, p. 169-175, Mar 2014.

NICODEMO, S. C. T. e S. **Potencial de biodegradação de atrazina por *Bacillus megaterium* CCT 7935 e *Penicillium chrysogenum* NRRL 807 para biorremediação de solos contaminados.** 2021. Tesis (Doctorado en Biotecnología) - Universidad Federal de Río Grande del Norte, Natal - RN.

PAGE, A. P.; JOHNSTONE, I. L. **Wormbook: The Online Review of *C. elegans* Biology**, disponible en: <http://www.wormbook.org/>. Acceso en: Dic. 2022.

PILOTO, J. H.; RODRIGUEZ, M.; CHOE, K. P. Sexual dimorphism in *Caenorhabditis elegans* stress resistance. **PLoS ONE**, v. 17, n. 8, Ago 2022.

RAMÍREZ, J. D. P.; GARCÍA, J. F. S. **Revisión bibliográfica del uso de hongos en la biorremediación de suelos contaminados por agroquímicos.** 2020. Tesis (Ingeniería Ambiental) - Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad César Vallejo, Tarapoto - Perú.

REEVE, E. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics Research**, v. 52, n. 3, p. 243-246, Dec. 1988.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Conceptos generales. In: MORALES, G. C.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P.; RONCO, A.; SOBRERO, C.; ROSSINI, G. B.; FEOLA, G.; FORGET, G.; SÁNCHEZ-BAIN, A. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.** 1a. ed. México: IMTA (Instituto Mexicano de Tecnología del Agua), 2004. p. 17-22.

SALAZAR-LEDESMA, M.; MORA, L.; CHÁVEZ, B.; GÓMEZ, D.; ZAMORA, O.; PRADO, B. Susceptibilidad del suelo al impacto humano: caso del herbicida atrazina. **Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana**, v. 70, n. 1, p. 95-119, 2018.

SARAIVA, R. M.; FRANÇA, P. E. M.; BORGES, Á. V.; MAFFIA, L. A. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrol. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 31, n. 1, p. 78-91, Jun 2014.

SEPÚLVEDA, T. V.; TREJO, J. A. V. **Tecnologías de remediación para suelos contaminados.** Ed. 1. México, D.F.: Instituto Nacional de Ecología, 2002.

SILVA, S. B. **Efeitos toxicológicos do herbicida atrazina sobre o balanço oxidativo, regulação hormonal e desempenho produtivo de juvenis *Astyanax altiparanae*.** 2021. Disertación (Pós graduación en Biología Animal) - Departamento de Biología Animal, Universidad Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

SILVA, P. G. O. da; MENDONÇA, R. de S.; COSTA, E. R. C.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. de; ANDRADE, R. F. da S.; RODRÍGUEZ, D. M. Bioprospection of filamentous fungi

isolated from mangrove sediments of Pernambuco state for petroderivatives biodegradation. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, Jul 2022.

SILVA, F. H. K. P. da; ANTUNES, L. F. de S.; VAZ, A. F. de S.; SILVA, M. S. R. de A. Pesticides in Brazil: an understanding of the current scenario of use and the properties of the soil that act on the dynamics and retention of these molecules. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, Jul 2020.

SOUZA, A. J. **O papel do microbioma na degradação de pesticidas em solos agrícolas**. 2020. Monografia (Especialización en Suelos y Nutrición de Plantas) - Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo, Piracicaba - SP.

SOUZA, A. J.; ANDRADE, P. A. M.; PEREIRA, A. P. A.; ANDREOTE, F. D.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. The depleted mineralization of the fungicide chlorothalonil derived from loss in soil microbial diversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, Nov 2017.

SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. OrthoList: A Compendium of *C. elegans* Genes with Human Orthologs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, May 2011.

SUN, Z.-B.; LI, S.-D.; REN, Q.; XU, J.-L.; LU, X.; SUN, M.-H. Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486-495, Mar 2020.

SUTER II, G. W. **Ecological risk assessment**. 2 ed. Boca raton: CRC Press, 2006.

SRIVASTAV, A. L. Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. In: PRASAD, M. N. V. **Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation: Pesticides and Chemical Fertilizers**. Ed. Elsevier, 2020. p. 143-159.

STERNBERG, P. W. Vulval development. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, Jun 2005.

TABARES, G. G.; MORDECAY, V. C. Disruptores endócrinos en reproducción. **Revista Colombiana de Menopausia**, v. 26, n. 1, p. 7-19, 2020.

TAVARES, S. S. **Avaliação da toxicidade da Atrazina livre e Atrazina nanoencapsulada no desenvolvimento e metabolismo mitocondrial em *Drosophila melanogaster***. 2019. Disertación (Pos graduación en Bioquímica) - Facultad de Medicina, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.

TAVARES, D. C. G.; SHINODA, D. T.; MOREIRA, S. S. da C.; FERNANDES, A. da C. Utilização de agrotóxicos no Brasil e sua correlação com intoxicações. **Sistema & Gestão**, v. 15, n. 1, p. 2-10, Abr 2020.

TOLLER, N.; GUIMARÃES, E.; BRAVO, C. Biodegradação do herbicida atrazina por *Saccharomyces cerevisiae*. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, n. 4, p. 651-658, Ago 2021.

TUDI, M.; RUAN, H. D.; WANG, L.; LYU, J.; SADLER, R.; CONNELL, D.; CHU, C.; PHUNG, D. T. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, Ene 2021.

VALDERRAMA, J. F. N.; BAENA, J. A. P.; PÉREZ, F. J. M. Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: una revisión de los procesos de degradación natural. **Gestión y Ambiente**, v. 15, n. 3, p. 27-38, Dic 2012.

WHITE, J. G.; SOUTHGATE, J. N.; THOMSON, BRENNER, S. The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 314, p. 1-340, Nov 1986.

WAH CHU, K.; CHOW, K. L. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. **Aquatic Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 53-64, Nov 2002.

YAMAWAKI, T. M.; ARANTES-OLIVEIRA, N.; BERMAN, J. R.; ZHANG, P.; KENYON, C. Distinct activities of the germline and somatic reproductive tissues in the regulation of *Caenorhabditis elegans*' longevity. **Genetics**, v. 178, n. 1, p. 513-26, Ene 2008.

ZHANG, N.; KHAN, L. A.; MEMBRENO, E.; JAFARI, G.; YAN, S.; ZHANG, H.; GOBEL, V. The *C. elegans* Intestine As a Model for Intercellular Lumen Morphogenesis and In Vivo Polarized Membrane Biogenesis at the Single-cell Level: Labeling by Antibody Staining, RNAi Loss-of-function Analysis and Imaging. **Journal of Visualized Experiments**, v. 128, Oct 2017.

ZHANG, X.; WANG, M.; GAO, S.; REN, R.; ZHENG, J.; ZHANG, Y. Atrazine-induced apoptosis of splenocytes in BALB/C mice. **BMC Medicine**, v. 9, n. 117, Oct 2011.

ZHONG-QIN, W.; KE, L.; JIN-KUI, M.; ZONG-JUN, L. Effects of ethanol intake on anti-oxidant responses and the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. **CyTA - Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 288-296, Feb 2019.

ZHOU, R.; LIU, R.; LI, W.; WANG, Y.; WAN, X.; SONG, N.; YU, Y.; XU, J.; BU, Y.; ZHANG, A. The use of different sublethal endpoints to monitor atrazine toxicity in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v. 274, Jul 2021.

9 APÉNDICE

Cuadro 3. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 1 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

LOCOMOCION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C2B	37	25	33	34	30	28	40	40	39	41
	40	40	32	33	27	32	42	35	42	33
	40	38	5	7	35	22	43	28	32	27
	39	34.33333333	23.33333333	24.66666667	30.66666667	27.33333333	41.66666667	34.33333333	37.66666667	33.66666667
CN2B	44	31	44	43	22	40	46	43	41	28
	49	41	32	37	42	43	31	30	39	38
	43	34	43	36	38	43	43	38	42	39
	45.33333333	35.33333333	39.66666667	38.66666667	34	42	40	40	40.66666667	35
EC2B	30	44	29	33	31	44	38	42	43	38
	32	37	28	28	44	39	44	37	40	42
	34	39	35	32	42	44	40	39	34	45
	32	40	30.66666667	31	39	42.33333333	40.66666667	39.33333333	39	41.66666667
E2B	40	13	35	33	38	38	32	33	35	40
	45	35	41	40	39	44	26	40	33	46
	31	30	39	35	35	33	25	40	32	45
	38.66666667	26	38.33333333	36	37.33333333	38.33333333	27.66666667	37.66666667	33.33333333	43.66666667

Cuadro 4. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 2 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

LOCOMOCION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C2B	30	40	31	32	26	23	21	21	32	23
	32	39	21	36	29	28	24	21	33	35
	25	39	30	36	34	28	23	24	29	21
	29	39.33333333	27.33333333	34.66666667	29.66666667	26.33333333	22.66666667	22	31.33333333	26.33333333
CN2B	37	32	35	45	45	42	32	36	27	20
	33	27	38	43	30	37	37	37	29	37
	31	43	38	43	42	34	37	40	35	27
	33.66666667	34	37	43.66666667	39	37.66666667	35.33333333	37.66666667	30.33333333	28
EC2B	44	38	45	26	37	26	36	41	33	27
	41	39	35	16	43	42	32	27	33	27
	28	25	29	26	41	35	34	32	30	12
	37.66666667	34	36.33333333	22.66666667	40.33333333	34.33333333	34	33.33333333	32	22
E2B	42	30	34	29	38	37	34	35	38	37
	32	28	41	37	33	36	21	28	39	34
	44	27	39	36	24	30	25	23	28	36
	39.33333333	28.33333333	38	34	31.66666667	34.33333333	26.66666667	28.66666667	35	35.66666667

Cuadro 5. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 3 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

LOCOMOCION										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C3B	32	35	41	34	44	39	30	39	37	43
	38	30	40	45	40	34	39	40	46	45
	36	40	38	43	39	26	42	41	33	40
	35.33333333	35	39.66666667	40.66666667	41	33	37	40	38.66666667	42.66666667
CN3B	35	46	42	43	41	40	35	33	36	33
	38	34	48	43	43	42	39	30	35	42
	37	36	43	41	30	37	36	36	40	30
	36.66666667	38.66666667	44.33333333	42.33333333	38	39.66666667	36.66666667	33	37	35
EC3B	39	42	34	45	41	39	40	43	41	40
	36	40	39	45	40	36	45	37	39	42
	46	46	40	48	32	28	38	32	38	45
	40.33333333	42.66666667	37.66666667	46	37.66666667	34.33333333	41	37.33333333	39.33333333	42.33333333
E3B	41	37	34	42	34	40	32	43	37	30
	29	37	36	45	44	40	30	27	45	33
	45	43	47	33	40	37	33	37	40	30
	38.33333333	39	39	40	39.33333333	39	31.66666667	35.66666667	40.66666667	31

Cuadro 6. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 1 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

LOCOMOCION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C1B	33	30	27	29	36	35	39	38	34	30	
	24	35	29	27	38	32	38	38	25	32	
	32	37	32	30	35	35	34	33	32	27	
	29.666667	34	29.333333	28.666667	36.333333	34	37	36.333333	30.333333	29.666667	32.533333
CN1B	34	32	30	34	30	30	31	32	33	33	
	32	30	30	27	38	32	37	29	20	30	
	33	22	33	32	30	33	30	29	23	32	
	33	28	31	31	32.666667	31.666667	32.666667	30	25.333333	31.666667	30.7
EC1B	26	36	33	33	31	24	28	36	26	35	
	20	33	20	34	25	23	36	32	28	30	
	32	30	35	35	21	27	31	30	32	20	
	26	33	29.333333	34	25.666667	24.666667	31.666667	32.666667	28.666667	28.333333	29.4
E1B	32	25	33	33	30	32	28	31	26	26	
	32	25	30	32	30	18	36	33	27	28	
	27	39	32	32	25	28	32	31	27	30	
	30.333333	29.666667	31.666667	32.333333	28.333333	26	32	31.666667	26.666667	28	29.666667

Cuadro 7. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 2 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

LOCOMOCION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C2B	24	31	23	30	33	40	30	32	38	32	
	22	21	35	25	38	35	30	27	33	32	
	25	26	23	27	33	20	30	27	38	32	
	23.666667	26	27	27.333333	34.666667	31.666667	30	28.666667	36.333333	32	29.733333
CN2B	33	21	34	30	33	26	25	32	32	37	
	33	37	34	38	36	30	35	33	35	33	
	33	32	34	40	30	34	31	35	34	33	
	33	30	34	36	33	30	30.333333	33.333333	33.666667	34.333333	32.766667
EC2B	33	32	35	36	29	33	30	28	30	26	
	29	33	32	33	29	32	28	30	27	27	
	33	33	30	26	30	27	30	29	21	29	
	31.666667	32.666667	32.333333	31.666667	29.333333	30.666667	29.333333	29	26	27.333333	30
E1B	24	26	35	35	35	30	40	34	34	35	
	33	32	34	35	34	32	33	27	32	30	
	30	34	33	35	33	30	34	32	29	33	
	29	30.666667	34	35	34	30.666667	35.666667	31	31.666667	32.666667	32.433333

Cuadro 8. Cuantificación del número *thrashes* en un intervalo de 20 segundos - Experimento 2 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

LOCOMOCION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C3B	29	29	29	27	23	29	31	40	21	33	
	35	33	26	29	25	30	30	40	34	29	
	29	26	24	29	23	33	29	33	34	30	
	31	29.333333	26.333333	28.333333	23.666667	30.666667	30	37.666667	29.666667	30.666667	29.733333
CN3B	35	36	36	37	32	31	34	40	30	35	
	29	37	39	32	30	39	34	35	29	33	
	30	34	33	34	33	37	34	40	31	32	
	31.333333	35.666667	36	34.333333	31.666667	35.666667	34	38.333333	30	33.333333	34.033333
EC3B	36	40	35	37	31	29	40	27	35	35	
	37	35	35	36	30	30	40	34	40	36	
	36	34	35	25	30	34	40	32	38	34	
	36.333333	36.333333	35	32.666667	30.333333	31	40	31	37.666667	35	34.533333
E3B	32	37	37	35	33	33	31	39	33	35	
	31	36	35	25	30	30	33	37	32	36	
	32	37	34	30	38	32	35	36	30	33	
	31.666667	36.666667	35.333333	30	33.666667	31.666667	33	37.333333	31.666667	34.666667	33.566667

Cuadro 9. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 1 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

BOMBEO FARINGEO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C2B	68	60	58	63	66	65	68	68	68	63
	49	62	64	69	67	60	69	69	70	61
	60	57	55	67	67	61	70	66	66	73
	59	59.666667	59	66.333333	66.666667	62	69	67.666667	68	65.666667
CN2B	67	81	70	68	64	71	76	72	70	77
	58	78	66	60	78	73	70	74	67	76
	75	79	69	68	78	68	72	73	59	74
	66.666667	79.333333	68.333333	65.333333	73.333333	70.666667	72.666667	73	65.333333	75.666667
EC2B	84	50	71	67	70	70	75	70	70	77
	72	69	76	56	73	73	75	67	70	73
	60	70	74	64	67	60	58	71	77	72
	72	63	73.666667	62.333333	70	67.666667	69.333333	69.333333	72.333333	74
E2B	82	44	50	68	68	66	71	67	70	77
	72	48	50	67	70	64	70	68	79	66
	70	47	59	70	61	57	74	66	65	73
	74.666667	46.333333	53	68.333333	66.333333	62.333333	71.666667	67	71.333333	72

Cuadro 10. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 2 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

BOMBEO FARINGEO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C2B	70	72	74	78	79	76	75	76	78	74
	76	73	66	74	75	75	69	77	76	81
	72	73	73	74	76	77	73	75	76	72
	72.666667	72.666667	71	75.333333	76.666667	76	72.333333	76	76.666667	75.666667
CN2B	77	72	70	70	68	77	77	74	74	76
	80	54	70	73	63	79	79	74	76	76
	81	73	68	72	69	79	70	73	73	76
	79.333333	66.333333	69.333333	71.666667	66.666667	78.333333	75.333333	73.666667	74.333333	76
EC2B	45	68	55	73	72	71	66	70	70	71
	67	66	45	74	70	73	70	66	71	70
	62	66	60	74	75	70	69	66	71	66
	58	66.666667	53.333333	73.666667	72.333333	71.333333	68.333333	67.333333	70.666667	69
E2B	62	57	68	72	67	66	66	62	69	72
	54	65	67	65	68	69	68	55	72	70
	65	63	70	65	67	63	67	55	67	69
	60.333333	61.666667	68.333333	67.333333	67.333333	66	67	57.333333	69.333333	70.333333

Cuadro 11. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 3 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

BOMBEO FARINGEO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C3B	84	79	89	70	87	76	82	82	76	86
	81	75	68	70	83	79	78	80	80	80
	85	80	76	77	80	76	79	80	77	83
	83.333333	78	77.666667	72.333333	83.333333	77	79.666667	80.666667	77.666667	83
CN3B	68	73	70	68	71	72	78	79	80	78
	78	75	69	67	71	77	75	78	77	73
	71	66	72	66	70	77	66	75	75	76
	72.333333	71.333333	70.333333	67	70.666667	75.333333	73	77.333333	77.333333	75.666667
EC3B	70	73	72	75	73	74	76	70	72	75
	69	75	69	72	78	70	82	73	73	72
	71	73	72	70	76	74	71	75	78	73
	70	73.666667	71	72.333333	75.666667	72.666667	76.333333	72.666667	74.333333	73.333333
E3B	77	79	77	80	74	80	78	79	77	80
	80	79	80	80	70	83	84	80	76	83
	77	80	76	80	70	80	80	74	75	80
	78	79.333333	77.666667	80	71.333333	81	80.666667	77.666667	76	81

Cuadro 12. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 1 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

BOMBEO FARINGEOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C1B	79	75	70	64	78	78	73	68	75	70
	84	71	66	72	73	70	70	70	79	80
	78	67	70	68	72	67	79	67	64	67
	80.333333	71	68.666667	68	74.333333	71.666667	74	68.333333	72.666667	72.333333
CN1B	67	70	70	64	69	70	70	67	69	70
	70	70	70	67	69	69	70	70	70	69
	70	70	70	56	69	70	70	67	67	70
	69	70	70	62.333333	69	69.666667	70	68	68.666667	69.666667
EC1B	66	76	73	70	70	70	80	72	75	70
	73	70	74	71	69	70	75	73	73	71
	66	70	70	66	70	70	74	70	68	74
	68.333333	72	72.333333	69	69.666667	70	76.333333	71.666667	72	71.666667
E1B	80	73	68	75	70	76	75	72	71	69
	76	71	70	73	68	78	69	70	73	70
	78	70	70	70	73	70	73	69	76	68
	78	71.333333	69.333333	72.666667	70.333333	74.666667	72.333333	70.333333	73.333333	69

Cuadro 13. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 2 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

BOMBEO FARINGEOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C2B	83	76	67	75	77	67	75	83	77	85
	80	76	70	76	75	75	76	80	73	70
	80	80	67	70	75	70	75	76	73	80
	81	77.333333	68	73.666667	75.666667	70.666667	75.333333	79.666667	74.333333	78.333333
CN2B	72	75	75	69	74	70	70	32	66	70
	69	73	74	72	70	70	70	58	68	69
	70	74	70	72	70	70	69	60	70	70
	70.333333	74	73	71	71.333333	70	69.666667	50	68	69.666667
EC2B	77	78	70	74	74	75	69	73	70	72
	72	76	74	73	70	78	37	74	70	73
	74	70	73	70	70	74	71	71	70	70
	74.333333	74.666667	72.333333	72.333333	71.333333	75.666667	59	72.666667	70	71.666667
E1B	80	76	74	74	76	77	70	74	76	72
	79	72	73	74	75	76	70	74	75	73
	76	74	74	73	75	79	70	73	77	74
	78.333333	74	73.666667	73.666667	75.333333	77.333333	70	73.666667	76	73

Cuadro 14. Número de contracciones faríngeas en un intervalo de 20 segundos - Experimento 3 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

BOMBEO FARINGEOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C3B	70	76	80	76	76	73	65	76	77	77
	70	76	77	77	70	70	70	70	75	80
	68	76	73	75	71	70	70	71	71	71
	69.333333	76	76.666667	76	72.333333	71	68.333333	72.333333	74.333333	76
CN3B	75	70	73	70	73	75	70	73	70	71
	70	69	70	70	70	70	70	70	70	69
	70	70	69	73	70	70	71	75	73	70
	71.666667	69.666667	70.666667	71	71	71.666667	70.333333	72.666667	71	70
EC3B	73	74	62	70	69	75	66	72	62	70
	71	76	62	71	73	76	69	59	70	73
	70	75	62	73	68	74	67	67	73	72
	71.333333	75	62	71.333333	70	75	67.333333	66	68.333333	71.666667
E3B	68	78	79	72	75	80	80	77	75	69
	73	65	80	68	75	72	75	73	69	69
	63	61	78	56	77	76	73	75	71	73
	68	68	79	65.333333	75.666667	76	76	75	71.666667	70.333333

Cuadro 15. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos -Experimento 1 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C1A	9	11	10	11	8	12	10	5	8	6	9
CN1A	8	7	5	5	4	3	8	7	4	5	5.6
EC1A	10	8	7	8	5	13	8	6	6	8	7.9
E1A	9	13	10	10	12	7	7	10	9	9	9.6

Cuadro 16. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos -Experimento 2 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C2A	13	12	11	10	10	11	13	11	12	11	11.4
CN2A	8	8	10	9	5	9	6	11	8	10	8.4
EC2A	7	7	7	7	7	9	6	6	7	6	6.9
E2A	10	12	11	9	7	8	8	13	8	12	9.8

Cuadro 17. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos -Experimento 3 para los ensayos con *Clonostachys rosea* CCMIBA_R018.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C3A	10	8	9	10	8	9	9	10	12	11	9.6
CN3A	9	10	12	9	10	11	12	12	15	11	11.1
EC3A	11	7	10	7	12	8	13	9	10	9	9.6
E3A	9	9	10	8	9	9	9	8	9	9	8.9

Cuadro 18. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos - Experimento 1 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C1A	14	11	13	13	14	11	12	11	13	12	12.4
CN1A	8	10	9	9	11	10	9	8	11	10	9.5
EC1A	12	12	11	9	10	12	8	11	12	9	10.6
E1A	9	9	6	6	8	10	7	7	8	8	7.8

Cuadro 19. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos - Experimento 2 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C2A	10	10	11	14	11	10	13	10	12	10	11.1
CN2A	11	9	8	8	7	9	8	14	9	7	9
EC2A	7	7	9	7	8	7	10	7	8	9	7.9
E1A	16	10	12	10	8	12	7	9	7	8	9.9

Cuadro 20. Cantidad de huevos presentes en el útero de los gusanos adultos - Experimento 3 para los ensayos con *Purpureocillium lilacinum* CCMIBA_R014.

CANTIDAD DE HUEVOS EN EL UTERO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
C3A	16	15	16	15	10	11	11	12	12	13	13.1
CN3A	11	10	8	16	15	13	12	15	11	8	11.9
EC3A	11	9	13	11	11	10	10	12	9	10	10.6
E3A	10	14	13	11	9	8	9	9	9	13	10.5