

## EFFECTO DE ALGUNOS PESTICIDAS SOBRE *Azospirillum lipoferum* Y *Azospirillum brasilense* EN CULTIVO PURO

R. Alvarez y L. A. Sleiman (1)

Recibido: 16/5/83

Aceptado: 19/9/83

### RESUMEN

El efecto de varios insecticidas y herbicidas se probó sobre 4 cepas de *A. lipoferum* y 4 cepas de *A. brasilense* en cultivo puro. Ninguno de ellos afectó la típica formación de película subsuperficial que caracteriza a estas especies.

De los productos usados se eligió heptacloro, atrazina y linurón para determinar sus efectos sobre la actividad nitrogenásica de algunas de las cepas y se halló que mientras ninguno afectaba la curva de actividad de *A. brasilense*, la atrazina y el linurón producían un corrimiento significativo del pico de actividad en *A. lipoferum*; sin embargo, su valor total acumulado luego de 4 días de incubación no fue afectado.

### EFFECTS OF SOME PESTICIDES ON *Azospirillum lipoferum* AND *Azospirillum brasilense* IN PURE CULTURE

### SUMMARY

The effects of some insecticides and herbicides were tested on 4 strains of *A. lipoferum* and 4 strains of *A. brasilense* in pure culture. None of them affected the development of the typical *Azospirillum* pellicle in semisolid medium.

Heptachlor, atrazin and linuron were selected to determinate their effects on the nitrogenase activity of some of the strains. No effects were observed on the activity curve of *A. brasilense* meanwhile atrazin and linuron produced an advance of the curve maximum in *A. lipoferum*. Cumulative nitrogenase activity was not affected in both cases.

### INTRODUCCION

El género *Azospirillum* esta formado por dos especies, *A. lipoferum* y *A. brasilense*, ambas capaces de fijar nitrógeno atmosférico. A medida que aumenta el conocimiento sobre ellas se hace más evidente su importancia en la fijación asociativa de nitrógeno, es-

pecialmente en relación con cultivos de gramíneas (Baldani y Döbereiner, 1980; Döbereiner y Baldani, 1979; Nur *et al.*, 1980 y Rai y Gaur, 1982). Se ha encontrado que algunos herbicidas pueden incrementar la capacidad de reducir acetileno de estas bacterias tanto a campo como en medios de cultivo (Marriell y Cruz, 1978).

(1) Centro de Radiobiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, (1417) Buenos Aires, Argentina.

Este trabajo se llevó a cabo para determinar los efectos de algunos insecticidas y herbicidas usados en la Argentina en cultivos de gramíneas, sobre el desarrollo y la capacidad de fijar nitrógeno de estas bacterias.

## MATERIAL Y METODOS

Los organismos utilizados fueron *A. li-poferum* cepas 1, 2, 3 y 4 y *A. brasilense* cepas 1, 2, 3 y 4, pertenecientes a la colección del Centro de Radiobiología.

Para realizar las siembras se hizo desarrollar a las cepas en un medio con la siguiente composición ( $\text{g.l}^{-1}$ ):

Acido málico	5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5
Extracto de levadura	0,05
PH ajustado a 6,8 con KOH	

Luego de que los cultivos desarrollaron 5 días a  $30^\circ\text{C}$  en este medio, se realizaron las siembras para el ensayo, con pipeta, a razón de 0,5 ml por tubo o frasco.

Tanto para evaluar el efecto de los plaguicidas sobre el desarrollo como sobre la ac-

tividad nitrogenásica de las cepas, se usó el mismo medio de cultivo con la incorporación de  $2\text{ g.l}^{-1}$  de agar, con lo que se obtiene una consistencia semisólida en la que *Azospirillum sp* forma película subsuperficial.

Los pesticidas usados en el ensayo, naturaleza, formulación y dosis se indican en el Cuadro 1. La incorporación al medio de cultivo se realizó haciendo diluciones de los formulados en agua estéril y agregándolas asepticamente al mismo. En todos los casos la pureza de los cultivos se determinó por observación microscópica.

El cálculo de la concentración se hizo suponiendo una profundidad de incorporación de 8 cm. Se consideró al suelo como un sistema compuesto por 50% de partículas sólidas, 25% de aire y 25% de agua. Con la simplificación expuesta se obtiene que existen  $200\text{ m}^3$  de agua en una hectárea y en función de este valor y de la dosis se determinó que concentración debía obtenerse de los productos en el medio de cultivo.

El efecto de los pesticidas sobre el desarrollo de las cepas se probó en tubos de ensayo de 10 mm de diámetro por 10 cm de lon-

CUADRO 1: Productos y dosis usadas.

Principio activo	Producto comercial	Naturaleza	Dosis ( $\text{kg pa.ha}^{-1}$ )	ppm en el medio de cultivo
Aldrin	Huagro-Aldrin	insecticida de suelo	3	15
Heptacloro	Heptacloro 33	insecticida de suelo	4	20
Lindano	Galgodane 15 E	insecticida de suelo	1	5
Acido 2-2 dicloropropiónico	Fitopon 85	herbicida de presiembra *	11	55
Epte +				
Dicloroacetamida	Erradicane	herbicida de presiembra	6,8	34
Molinate	Ornate	herbicida de presiembra *	5	25
Atrazina	Gesaprin 500 FW	herbicida de preemergencia	4,8	24
Alaclor	Lazo	herbicida de preemergencia	2,5	12,5
TCA	TECEA 95 G	herbicida de preemergencia	27	135
Linurón	Linurex	herbicida de preemergencia *	3	15
Propachlor	Ramrod 65	herbicida de preemergencia	5,2	26
Cloramben	Amiben	herbicida de presiembra	3,5	17,5
Metribuzin	Sencorex	herbicida de preemergencia *	1,4	7

\* estos herbicidas también pueden aplicarse en post-emergencia.

gitud con 2 ml de medio de cultivo. La formación de la película subsuperficial de *Azospirillum* fue el parámetro considerado.

La acción del heptacloro, la atrazina y el linurón sobre la capacidad de fijar nitrógeno de la cepa 1 de *A. lipoferum* y de la cepa 1 de *A. brasilense* se determinó por la medición de la actividad nitrogenásica. Para ello se usaron frascos tipo antibiótico de 27 ml de capacidad con 10 ml del medio semisólido. Luego de 24, 48, 72 y 96 horas de incubación a 30° C, tandas de estos frascos se sellaron con tapones de goma y tras remover 10% de la atmósfera de los mismos e inyectar acetileno para obtener una presión de 0,1 atmósferas, se incubaron 3 horas más a la misma temperatura, haciéndose la determinación del etileno producido por espectrofotometría (La Rue y Kurz, 1973).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Ninguno de los productos ensayados afectó el desarrollo de las cepas a juzgar por la observación visual y microscópica de los cultivos. En todos los casos, 24 horas luego de la siembra se formó la típica película subsuperficial, blanca y densa de *Azospirillum* sp y los organismos no presentaron alteraciones morfológicas. Las observaciones se siguieron realizando hasta una semana luego de la siembra sin detectar diferencias entre los tratamientos y los testigos.

El incremento de la concentración de los pesticidas a un valor 10 veces mayor tampoco produjo efectos observables.

*A. brasilense* demostró una mayor actividad nitrogenásica respecto de *A. lipoferum*. Los picos de sus curvas de actividad (Figura 1) fueron aproximadamente 3 veces superiores a los de *A. lipoferum* (Figura 2) y la actividad nitrogenásica acumulada, calculada como la superficie definida por cada curva, fue unas 4 veces mayor. (Cuadros 2 y 3)

En otras oportunidades, usando metodologías semejantes a la descripta, se ha observado mayor capacidad de reducir acetile-

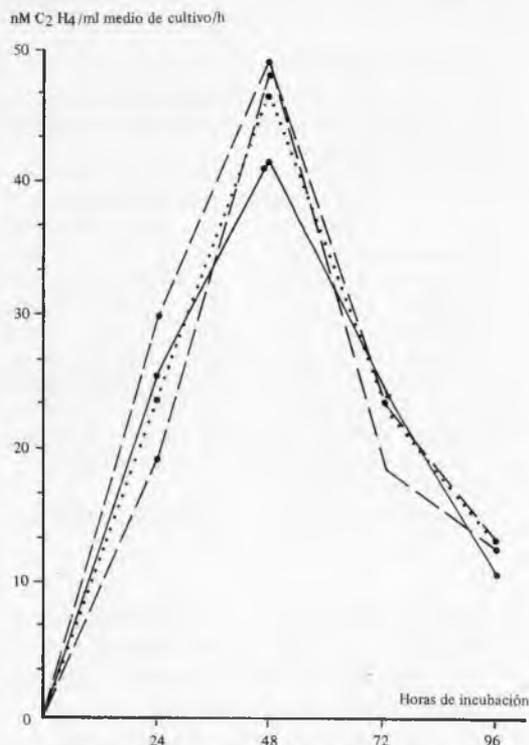


Figura 1: Ritmo de reducción de acetileno de *A. brasilense*.

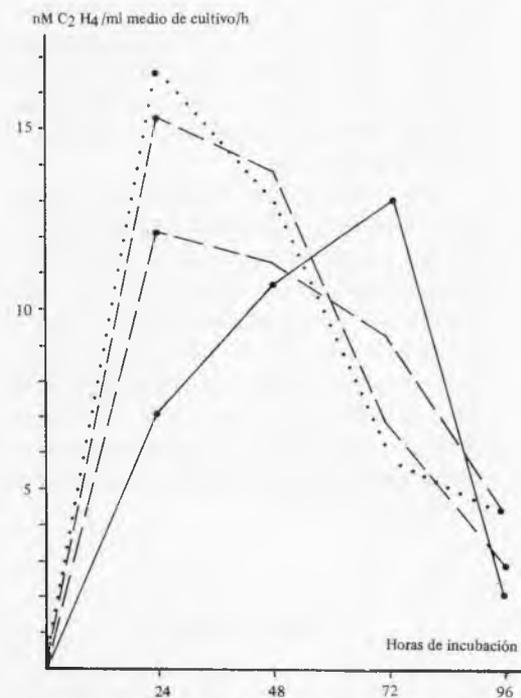


Figura 2: Ritmo de reducción de acetileno de *A. lipoferum*.

CUADRO 2: Actividad nitrogenásica acumulada de *A. brasilense* nM de etileno producido por mililitro de medio de cultivo.

Tratamiento	Tiempo de incubación (horas)			
	24	48	72	96
Testigo	456	1.657	2.856	3.507
Heptacloro	316	1.508	2.783	3.433
Atrazina	533	1.932	3.106	3.624
Linurón	423	1.686	2.952	3.569

Ningún valor significativamente distinto del testigo para ANVA y prueba de Dunnett con nivel de significación de 0,05.

CUADRO 3: Actividad nitrogenásica acumulada de *A. lipoferum* nM de etileno producido por mililitro de medio de cultivo.

Tratamiento	Tiempo de incubación (horas)			
	24	48	72	96
Testigo	83	294	578	756
Heptacloro	135	415	660	822
Atrazina	183 *	533 *	778	890
Linurón	200 *	556 *	778	895

\* significativamente diferentes del testigo para ANVA y prueba de Dunnett con nivel de significación de 0,01.

no de cepas de *A. brasilense* en relación a cepas de *A. lipoferum* y esto sugiere una mayor capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de esa especie en cultivo puro.

El pico de actividad nitrogenásica en *A. brasilense* se produjo a las 48 horas de la siembra, tanto para el testigo como para los tratamientos (Figura 1) y no hubo diferencias significativas en la actividad nitrogenásica acumulada en ningún momento del ensayo (Cuadro 2), lo que indica que los productos no afectaron la capacidad de reducir acetileno de la bacteria.

En *A. lipoferum*, el heptacloro, la atrazina y el linurón produjeron un adelanto en el tiempo del punto máximo de la curva de actividad nitrogenásica (Figura 2) y su valor acumulado fue significativamente mayor al del testigo a las 24 y 48 horas de incubación para atrazina y linurón (Cuadro 3), pero no hubo diferencias de significación al finalizar el ensayo entre testigo y tratamientos lo que indica que la capacidad total de fijar nitrógeno no fue afectada.

## CONCLUSION

- 1) Los productos ensayados no afectaron la formación de película subsuperficial de las cepas de *Azospirillum* aplicados en do-

sis de uso agrícola y dosis 10 veces mayores.

- 2) *A. brasilense* presentó en cultivo puro una capacidad de reducir acetileno mayor que *A. lipoferum*.
- 3) El heptacloro, la atrazina y el linurón no afectan el ritmo de la actividad nitrogenásica de *A. brasilense* ni su valor total acumulado luego de 4 días de cultivo.
- 4) La atrazina y el linurón (o alguno de los componentes de sus formulados) producen un aumento del ritmo de reducción de acetileno en *A. lipoferum* en los primeros días de incubación pero no influyen sobre la actividad nitrogenásica total. El heptacloro no tuvo efecto sobre ninguna de las dos variables en esta especie.

Los resultados obtenidos indican que los productos que se probaron no afectan mayormente a las especies del género *Azospirillum* en cultivo puro, restando determinar mediante ensayos pertinentes si efectos como los observados se producen a campo.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Baldani, V. L. D. and J. Döbereiner, 1980. Host-plant specificity infection of cereals with *Azospirillum spp* *Soil Biol. Biochem.* 12: 433-439.

- 2) Döbereiner, J. and V. L. D. Baldani, 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 1.264-1.269.
  - 3) LaRue, T. A. and W. G. W. Kurz, 1973. Estimation of nitrogenase using a colorimetric determination for ethylene. *Plant Physiol.* 51: 1.074-1.075.
  - 4) Marriell, I. E. and J. C. Cruz, 1978. Increased  $N_2$  fixation ( $C_2 H_2$ ) in field grown maize by herbicide treatments. Alexander Hollaender, Gen. Editor. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. Plenum Press-New York and London. Pag. 340. Basic Life Sciences Vol. 10.
  - 5) Nur, I.; Y. Okon and Y. Henis, 1980. An increased in nitrogen content of *Setaria italica* and *Zea mays* inoculated with *Azospirillum*. *Can. J. Microbiol.* 26: 482-485.
  - 6) Rai, S. N. and A. C. Gaur, 1982. Nitrogen fixation by *Azospirillum spp* and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-uptake of the wheat crop. *Plant and Soil* 69: 233-238.
-