

EFFECTO DE LA APLICACION DE HERBICIDAS SOBRE EL NUMERO Y LA FRECUENCIA DE CEPAS FUNGICAS CELULOLITICAS Y QUERATINOLITICAS DE SUELOS CULTIVABLES.*

Delia P. Alvarez, Alicia G. Luque, & Juan C. Papa.

Departamento de Microbiología (Area Micología).

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Suipacha 531. Rosario (2000). Santa Fe. República Argentina.

Palabras clave : Herbicidas, hongos celulolíticos-queratinolíticos, suelos agrícolas.

Key words: Herbicides, cellulolytic-keratinolytic fungi, agricultural soils.

RESUMEN

Se estudió en muestras de suelos de parcelas cultivables con tratamiento herbicida, el efecto de algunos agroquímicos en la capacidad de colonización de la micota total y en especial la celulolítica y queratinolíticas de tales parcelas. Los herbicidas de prueba fueron: derivados de dinitroanilinas, como, atrazinas, tiocarbamatos e imidazolinonas (Trifluralina, Metazulfuronmetil, Metribuzin, Etil-propil tiocarbamato (E.P.T.C.), Imazaquim e Imazethapyr, respectivamente). El muestreo de suelos practicado respondió al diseño estadístico de bloques al azar, con tres submuestras cada uno. Aplicando la técnica de dilución y siembra en medios de cultivos generales y selectivos (anzuelo queratinoso), se realizó el recuento de colonias correspondientes a las 3 categorías mencionadas, así como la determinación de la frecuencia de las especies dominantes.

Todos los tratamientos del ensayo provocaron una disminución de las colonias de la micota total y celulolítica con respecto a los testigos, siendo más acentuada esta disminución para los herbicidas Imazethapyr e Imazaquim. Entre las cepas celulolíticas, *Fusarium solani* y *F. oxysporum* mostraron la mayor resistencia a la acción fitotóxica de todos los herbicidas aplicados.

Dos hongos queratinolíticos, tales como, *Keratinomyces ajelloi* y *Chrysosporium keratinophilum*, no fueron afectados por la aplicación de los herbicidas y mantuvieron constante su dominancia.

SUMMARY

[Effects of herbicides on the number and frequency of cellulolytic and keratinolytic fungal strains in agricultural soils]

The effect of some agrochemicals on the capacity of colonization of total mycota, mainly cellulolytic and keratinolytic, was studied on samples of soils of agricultural farms with herbicide treatment. The herbicides tested were derived from: dinitroanilines such as, atrazines, tiocarbamates and imidazolinones, which are known as: Trifluraline, Metazulfuronmetil, Metribuzin, Etil-propil-tiocarbamates (E.P.T.C.), Imazaquim and Imazethapyr respectively. The sampling of soils analyzed was according to the statistical design of blocks at random, with three subsamples each one of them.

Applying in general the dilution technique and selective media isolation (hair bait), the recounting of colonies corresponding to the 3 categories mentioned was carried out, well as the determination of the frequency of the dominant species.

All the treatments of the essay produced a decrease of the colonies of the total and cellulolytic mycota in reference to the witnesses, being this decrease higher for the herbicides Imazethapyr and Imazaquim. Among the cellulolytic strains, *Fusarium solani* and *F. oxysporum* showed the highest resistance to the phytotoxic action of all the applied herbicides.

Two keratinolytic fungi, such as: *Keratinomyces ajelloi* and *Chrysosporium keratinophilum*, were not affected by the application of the herbicides and maintained their constant dominance.

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

INTRODUCCION

El empleo habitual de variados agroquímicos con acción herbicida o desmalezante, tienden a optimizar el rendimiento de las plantaciones agrícolas y la persistencia de los residuos de estos productos (8) (9) (10), así como el interés por conocer la influencia de los mismos sobre las poblaciones microbianas de los suelos (4) que como es de conocimiento general, tienen un rol fundamental en el reciclaje de nutrientes y la estructuración de estos sistemas. Estas poblaciones están en continua adaptación frente a las múltiples variables ambientales que directa o indirectamente inciden en su equilibrio, de manera tal que la incorporación de compuestos altamente reactivos, como son los fitotóxicos, pueden dar lugar a cambios y efectos difíciles de registrar in situ.

Sobre este aspecto, grupos de trabajo como los de Voets y col. (12.) han sostenido que la medida de la actividad enzimática de los suelos, como el balance O_2 / CO_2 , permiten valorar el grado de alteración que producen los tratamientos químicos, para otros autores como Greaves y Malkomes (3), deben sumarse además de los estudios metabólicos, la estimación cuantitativa de la comunidad microbiana. En ese sentido hemos observado un efecto depresivo por 3 herbicidas preemergentes: Atrazina, Metribuzín y Alachlor, sobre la capacidad de colonización de especies fúngicas queratinolíticas (1) (2), es decir degradadores de proteínas fibrilares insolubles, como las alfa y β queratinas; ante estos resultados, nos planteamos el interés por conocer la respuesta de este grupo fúngico y del denominado como celulolítico, a otros biocidas vegetales derivados de las dinitroalinas, atrazinas, tiocarbamatos e imidazolinonas (Trifluralina, Metazulfuron-metil, Metribuzín, Etil-propil-tiocarbamate (E.P.T.C.). Imazaquin e Imazethapyr respectivamente).

Las muestras de los suelos en estudio, se procesaron para conocer, además el número de partículas viables o propágulos de la micota total, junto a las determinaciones del contenido de materia orgánica, nitrógeno total, pH y humedad.

Los resultados de estas experiencias constituyen el motivo de este informe.

MATERIALES Y METODOS

Se practicó la aplicación de los seis herbicidas de prueba mencionados con las dosis convencionales, en parcelas cultivables de pradera (en una época de

presiembr) ubicadas en el predio del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Oliveros, Santa Fe (Argentina).

Para el muestreo de los suelos se aplicó el diseño estadístico de bloques al azar con tres submuestras cada uno y en los tiempos: 0 antes del tratamiento y a los 7, 15, 30 y 60 días posteriores al mismo, procediendo en igual forma con las parcelas testigos.

Con cada muestra, previo tamizado por malla de 2 mm, se procedió a realizar por duplicado los siguientes estudios:

a) **Recuento total de colonias fúngicas.** A partir de una suspensión al 10% de la muestra homogeneizada en agitador a 120 r/min durante 10 minutos, se realizaron diluciones hasta 1×10^{-4} y 1×10^{-5} , de acuerdo al número conveniente para el recuento considerando como mínimo 30 colonias por placa de Petri. Un ml de las diluciones se sembró por duplicado en 10 ml de Agar Papa Dextrosa (APD), adicionado de 0,1 ml. de Rosa de Bengala 1: 150 y 0,1 ml. de Cloranfenicol 50 ug/ml.

Las placas se incubaron durante 7 días a 28°C. El recuento se expresó por u.f.c/ gramo de suelo.

b) **Recuento de colonias celulolíticas.** Tal determinación se realizó de acuerdo a la técnica de Eggins (1962), modificada. Un ml de las diluciones de las muestras, se sembró en 10 ml del medio Agar-sales-celulosa (AC) compuesto por sulfato de amonio 0,5 g; fosfato monopotásico 1,0 g; cloruro de potasio 0,5 g; sulfato de magnesio 0,2 g; cloruro de calcio 0,1 g; L-asparagina 05 g; carboximetilcelulosa 10 g; agar 20 g; agua destilada 1000 ml. El pH luego de autoclavar el medio a 1,5 atm. 15 minutos, fue de 6,20.

c) **Aislamiento de cepas queratinolíticas:** Se aplicó la técnica de cultivo en placas de Petri sobre anzuelo queratinoso (11), adicionando crin de caballo estéril, incubándose a temperatura ambiente por un lapso de 30 días y subcultivos de las cepas más frecuentes en agar Sabouraud glucosado a 25°C.

d) **Estudio estadístico.** Se empleó la técnica de análisis de la varianza correspondiente a un diseño completamente aleatorio, con 3 factores fijos: medio de cultivo, tiempo de aplicación y herbicida empleado. Las diferencias entre las medias de cada herbicida empleado, para cada tiempo y cada medio de cultivo, se consideraron

significativas cuando fueron menores o iguales a $p=0,01$.

d) **Determinación del pH, carbono orgánico oxidable, materia orgánica y nitrógeno total.** El pH se valoró en peachímetro digital Corning y con una relación suelo-agua de 1:10 (5), carbono orgánico oxidable acorde a la técnica de Walkley-Black (6), materia orgánica como producto del dato anterior y el factor 1.726, nitrógeno total por el macro método de Kjeldahl (7).

RESULTADOS Y DISCUSION

El número promedio de aislamientos correspondiente a la micota total y celulolítica, obtenida de las parcelas tratadas con Metsulfurón-metil, Metribuzín, Trifluralina, Etil-propil tiocarbamato, Imazaquim e Imazethapyr, juntamente con el alcanzado por el testigo se llevaron a los Gráficos: 1, 3, 5, 7, 2, 4, 6, y 8, respectivamente. Los datos estimados para un mismo grupo funcional, se determinaron en el mismo gráfico, tal es el caso de Metribuzín y Metsulfurón-metil; Imazaquim e Imazethapyr.

Para las parcelas testigos, las medias de los aislamientos no difirieron significativamente a través del tiempo, para cada uno de los medios de aislamiento usados. La media general del testigo para el medio (APD) fue de 91,0 (fig. 1) para el (AC) de 68,6 (fig. 2), valores indicativos de que la micota celulolítica es siempre inferior a la micota total. Considerando los recuentos de colonias en ambos medios, (APD) y (AC), todos los tratamientos del ensayo provocaron a los 7, 15, 30 y 60 días, una disminución significativa de las mismas con respecto a las parcelas testigos (fig. 1 a 8). Esta disminución es más acentuada para los productos Imazaquim e Imazethapyr, cuyas medias no difieren entre sí (fig 7 y 8). A su vez son similares entre sí, las medias calculadas para Metsulfurón-metil, Metribuzín, Etil-propil tiocarbamato y Trifluralina, tanto para la micota total como para la celulolítica, a los 15, 30 y 60 días (fig. 1 a 6).

A su vez, todos los herbicidas utilizados, mostraron un aumento significativo de los recuentos de colonias, tanto en (APD) como (AC), a medida que los intervalos de tiempo entre los muestreos fueron mayores, aunque siempre siguieron siendo inferiores al testigo (fig. 1 a 8).

La comparación de los datos entre las parcelas que recibieron distintos tratamientos, demuestra que los desmalezantes de prueba derivados de triazinas,

tiocarbamatos y dinitroanilinas, tienen un efecto depresivo similar para toda la población fúngica y dentro de ella para la celulolítica; en cambio en los que en su síntesis intervienen imidazolinonas, presentaron una marcada acción depresiva para la micota en general.

En cuanto a los aislamientos de las cepas reconocidas como queratinolíticas, todas las muestras sembradas de las parcelas con herbicidas mostraron la presencia de dos cepas dominantes: *Keratinomyces ajelloi* y *Chrysosporium keratinophilum*, también presentes en las parcelas testigo, junto a *Myceliophthora vellerea*.

En el cuadro N° 1, se determinaron las especies celulolíticas de estos suelos que alcanzaron la mayor frecuencia, relacionando el número de muestras en que se aislaron, con el número total de muestras analizadas. Tal frecuencia mostró variaciones al compararla con las parcelas del ensayo.

De acuerdo a estas variaciones se obtuvieron algunas especies pertenecientes a los géneros: *Aspergillus*, y *Fusarium*, con un mayor número de colonias, luego de la semana del tratamiento herbicida. Un segundo grupo de cepas decrece en frecuencia como las especies de *Gliocladium*, *Verticillium*, *Petriella*, *Curvularia* y *Alternaria*. El grupo restante varía de acuerdo al fitotóxico, así, colonias de *Trichoderma* y *Penicillium*, proliferan o mantienen el número de aislamientos en el suelo con Trifluralina y Etil-propil tiocarbamato y disminuyen frente a los demás herbicidas.

Se destaca el efecto depresivo de Imazaquim e Imazethapyr en gran parte de las cepas celulolíticas, observándose a *Fusarium solani* y *F. oxysporum*, como los más resistentes a esta acción fitotóxica.

La determinación del pH, materia orgánica y nitrógeno total no mostró variaciones significativas entre las parcelas tratadas y las testigos, obteniéndose un promedio de 6,17 para el pH 2,07% de materia orgánica y 0,21 % para el nitrógeno total.

CONCLUSIONES

En forma similar a lo observado con Atrazina, Metribuzín y Alachlor, para ciertas especies queratinolíticas (1) (2), con este otro grupo de agroquímicos, se comprobó además un efecto depresivo, tanto en la capacidad colonizante de la micota total, como en la celulolítica, comportamiento que se relaciona con la

Figura nº:1

MICOTA TOTAL

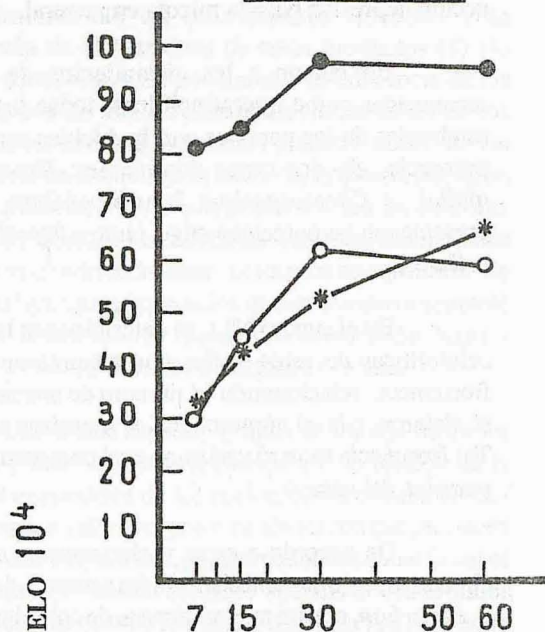
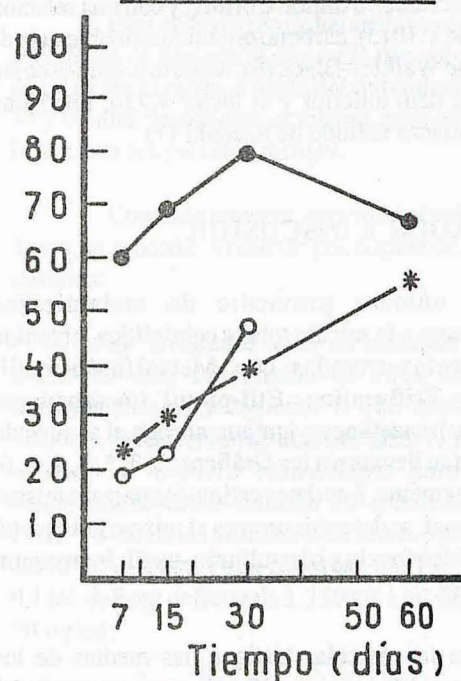


Figura nº:2

MICOTA CELULOLITICA



● Suelos testigos ○ Metsulfuron Metil *-* Metribuzin

Figura nº:3

MICOTA TOTAL

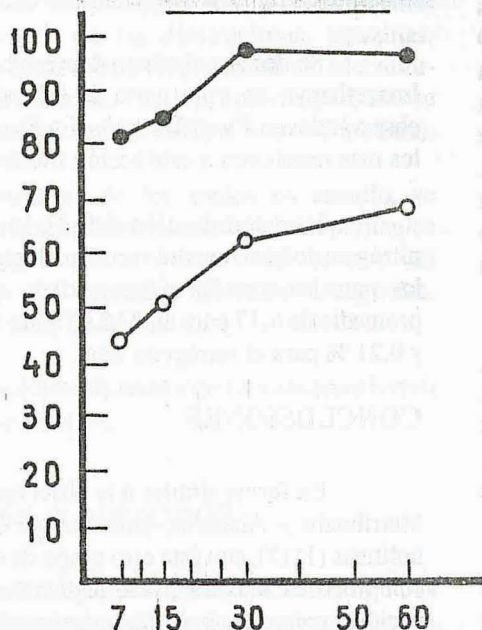
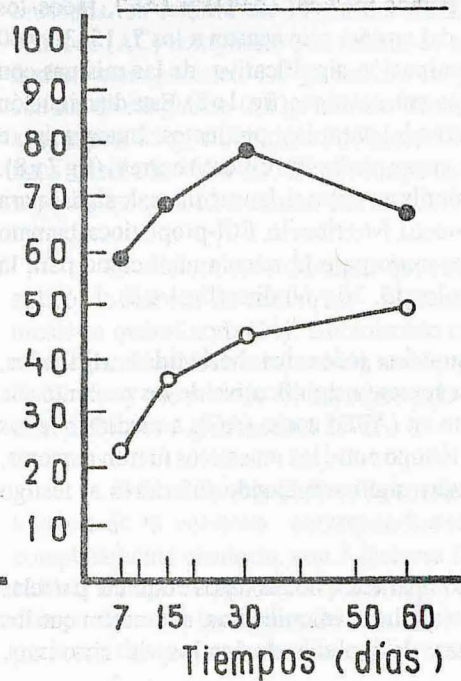


Figura nº:4

MICOTA CELULOLITICA



● Suelos testigos ○ Trifluralina

Figura nº: 5

MICOTA TOTAL

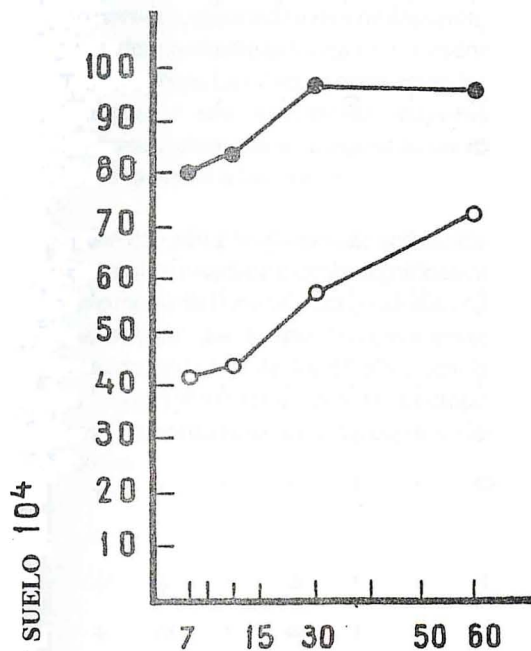
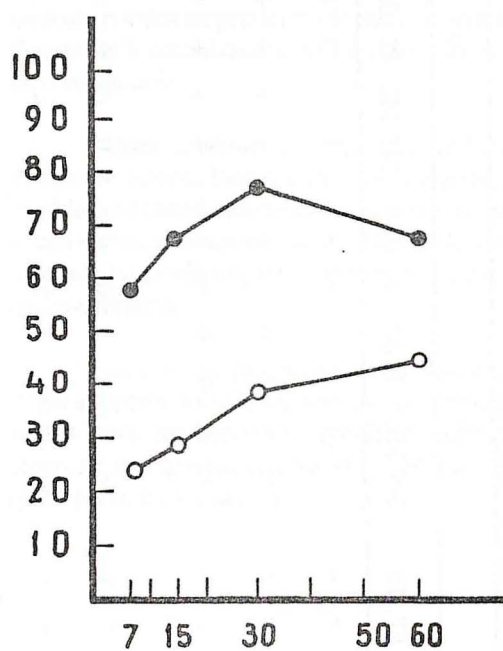


Figura nº: 6

MICOTA CELULOLITICA



U.F.C./g DE SUELO 10⁴

● Suelos testigos ○ Etil-propil-tiocarbamato

Figura nº: 7

MICOTA TOTAL

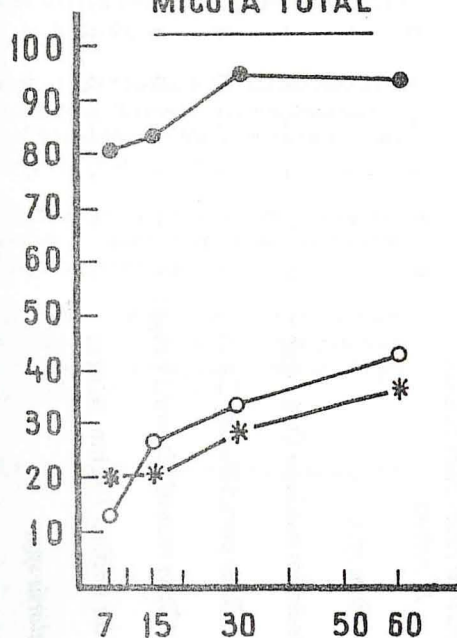
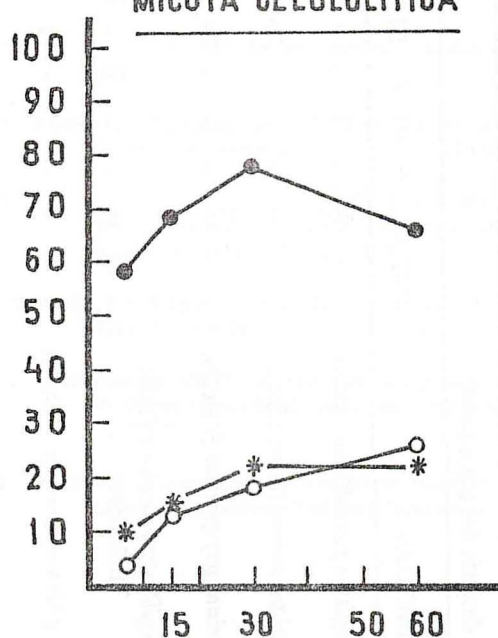


Figura nº: 8

MICOTA CELULOLITICA



● Suelos testigos *—* Imazaquin ○ Imazethapyr

CUADRO N° 1

GRADOS DE FRECUENCIA DE ESPECIES FUNGICAS CELULOLITICAS DE LAS PARCELAS CON TRATAMIENTO HERBICIDA.

Días después del tratamiento	7						15						30						60					
HERBICIDAS	ME	ME	IZ	IM	EP	TR	ME	ME	IZ	IM	EP	TR	ME	ME	IZ	IM	EP	TR	ME	ME	IZ	IM	EP	TR
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	0	0	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	0	0	-	-
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	+	+	-	-	-	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	+	+	-	-	+	+	0	0	-	-	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	0	0	-	-	+	+	0	0	-	-	+	+	+	+	-	-	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i> Wilhelm	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	0	0	-	-	-	-	+	-
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott	0	0	-	-	+	0	+	+	-	-	+	+	0	0	-	-	+	+	0	0	-	-	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	-	-	-	-	+	+	0	0	-	-	+	+	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma koningii</i> Oud. aggr.	0	0	-	-	+	+	0	0	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	0	0	-	-	+	+
<i>Gliocladium penicillioides</i> Corda	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viégas	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Petriella setifera</i> (Schm.) Curzi	-	-	-	-	0	+	+	+	-	-	0	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Curvularia spp.</i>	-	-	-	-	0	+	0	0	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
<i>Alternaria spp.</i>	-	-	-	-	0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	0	0
MT = Metsulfuron metil TR = Trifluralina	ME = Metribuzin (+) = Aumento de la frecuencia						IZ = Imazethapyr (-) = Disminución de la frecuencia						IM = Imazaquín						EP = Etil-propil-tiocarbamato (0) = Sin variación en la frecuencia					

afinidad del principio activo de los desmalezantes empleados. En este aspecto sobresalen los que derivan de las imidazolinas: Imazaquim e Imazethapyr.

Cabe señalar a este respecto, que la conjugación de los núcleos imidazólicos, piperazínicos y de dioxalón, sintetizan uno de los más efectivos antifúngicos utilizados en la terapéutica antimicótica. La relación entre estos dos efectos se desconoce, y son necesarios mayores conocimientos de las reacciones que se desen-cadenan al incorporarse tales compuestos a los suelos.

Se comprobó que aún a los 60 días de aplicación de los herbicidas, se produce una disminución significativa del promedio de las colonias de la micota total y celulolítica con respecto a los testigos, por lo que es conveniente prolongar los muestreos más allá de los 60 días, con la posibilidad de una mayor información acerca del tiempo requerido, para que en los suelos se alcance la recuperación de la micota autóctona.

La proliferación puesta de manifiesto por ciertas cepas, pudo darse a expensas de otros organismos competitivos que fueron afectados por los agroquímicos de prueba, o son hábiles para utilizar sus residuos o metabolitos como fuente de energía y de nutrición, como también pueden ser productos de una acción selectiva que determina la colonización de especies con mayor grado de competencia.

Estos cambios observados son índices también de modificaciones bioquímicas que tienen lugar ante el cambio de los niveles competitivos que caracteriza a cada grupo de las poblaciones celulolíticas, de acuerdo a la capacidad enzimática que puede desarrollar en el complejo de las celulasas.

La continuidad de tales modificaciones pueden llegar a superar la tendencia que naturalmente se da en los suelos para mantener el equilibrio entre todos sus componentes produciéndose alteraciones irreversibles que repercuten en su aprovechamiento.

REFERENCIAS

- 1.- Alvarez, D.P.; Luque, A.G. & Marini, P. (1986). Influencia de herbicidas sobre la micota queratinolítica de los suelos. Boletín Micológico, Vol. 3 : 81-85.
- 2.- Alvarez, D.P.; Luque, A.G.; Marini, P. & Gamberale, M.E. (1988). Influencia de herbicidas preemergentes sobre el desarrollo de dermatofitos geofílicos en suelos agrícolas. Boletín Micológico, Vol. 3 : 275-281.
- 3.- Greaves, M.P.; Malkomes, H.P. (1980). Effects on soil mycoflora. In R.J. Hance (ed). Interactions between herbicides and the soil. Academic Press London. pp. 231.253
- 4.- Huber, S.J.; Poschenrieder, G. & Wallnöfer, P.R. (1980). Effect of pesticides and the corresponding metabolites on growth and respiration of some soil microorganisms. Journal of Plant Diseases and Protection, 87 : 533-545.
- 5.- Jackson, M.L. (1964). Análisis químico de suelos. Edit. Omega, 67-70. (a)
- 6.- _____ (1964). Análisis químico de suelos. Edit. Omega, 300-303. (b)
- 7.- _____ (1964). Análisis químico de suelos. Edit. Omega, 261-264. (c)
- 8.- Kaufman, D.D.; Kearaway, P.C. (1970). Microbial degradation of S-triazine herbicides. Residue Rev. 32 : 235-265.
- 9.- _____ (1977). Microbial transformations in the soil. Soil Microbiology, 3ra. ed. Alexander, M. John Wiley and Sons Inc., cap. 2; 29.
- 10.- Smith, S.N. & Lyon, A.J.E. (1976). The uptake of Paraquat by soil fungi. New Phytol. 76: 479-484
- 11.- Vanbreuseghem, R. (1952). Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. Am. Société Belge de Med. Trop. 32 : 173-178.
- 12.- Voets, J.P.; Meerschman, P.; Verstraete, W. (1974). Soil microbiological applications. Soil, Biol. Biochem. 6 : 149