

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Efectos de los herbicidas derivados de piridina, picloram y  
3,6-D en la nitrificación y en la fijación de nitrógeno en la  
simbiosis Rhizobium-Leguminosa**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Esther Cadahia Fernández**

DIRECTOR:

**Margarita Flores Rodríguez**

Madrid, 2015



Tesis presentada por: ESTHER CADAHIA FERNANDEZ

EFFECTOS DE LOS HERBICIDAS DERIVADOS DE PIRIDINA, PICLORAM  
Y 3,6-D, EN LA NITRIFICACION Y EN LA FIJACION DE NITROGENO  
EN LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

Dirigida por: La Doctora MARGARITA FLORES RODRIGUEZ (Doc-  
tora en Ciencias Biológicas, Profesor Adjun-  
to del Departamento de Microbiología)



R. 23,075

Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Departamento de Microbiología  
Madrid, Noviembre de 1980

X5315424X

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra Dña Margarita Flores Rodríguez por la dirección y consejos recibidos en la realización de esta tesis.

Agradezco muy especialmente, al Profesor D. Juan Santamaría Ledochowski, la constante ayuda y sugerencias que de él he recibido, así como las facilidades y medios materiales que me ha proporcionado en el Departamento de Microbiología de la E.T.S. - de Ingenieros Agrónomos que dirige y donde se ha realizado el trabajo experimental de esta tesis.

Mi agradecimiento también:

Al Dr. D. Tomás Ruiz-Argueso por su asesoramiento en las técnicas de Reducción de Acetileno.

A los departamentos de Estadística y Ecología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias por su colaboración.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología de la E.T.S.I.A. por el apoyo prestado.

A Dña Laura Villa Vidaror por su estimable trabajo de mecanografía.

	Página
1.5.1.1. Aspectos generales de los efectos de los herbicidas en la nitrificación	40
1.5.1.2. Efectos de herbicidas hormonales en la nitrificación	45
1.5.2. Fijación de N <sub>2</sub> en la simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosa	48
1.5.2.1. Aspectos generales de la acción de herbicidas en la simbiosis <u>Rhizo-</u> <u>bium</u> -leguminosa	48
1.5.2.2. Aspectos generales de la acción de herbicidas en <u>Rhizobium</u> spp.	50
1.5.2.3. Efectos de herbicidas hormonales en <u>Rhizobium</u> spp y su simbiosis con leguminosas	53
1.6. Efectos de herbicidas piridínicos tipo auxina en el Ciclo del Nitrógeno	57
1.6.1. Antecedentes bibliográficos de la acción de herbicidas derivados de piridina en la nitrificación	57
1.6.2. Antecedentes bibliográficos de la acción de herbicidas derivados de piridina en <u>Rhizobium</u> spp. y su simbiosis con leguminosas	58
1.7. Objetivo de la presente tesis	59
 2. MATERIAL Y METODOS	 62
2.1. Ensayos sobre nitrificación	62
2.1.1. Cepas	62

2.1.2. Suelo	62
2.1.3. Herbicidas	63
2.1.4. Técnicas de percolación de suelo y métodos analíticos	65
2.1.5. Técnicas de solución de suelo y métodos analíticos	69
2.1.6. Técnicas de incubación de suelo y métodos de recuento de nitrificantes	71
2.1.7. Técnicas de cultivo puro de bacterias nitrificantes y métodos analíticos	73
2.2. Ensayos sobre <u>Rhizobium</u>	74
2.2.1. Cepas y su caracterización	74
2.2.2. Herbicidas	77
2.2.3. Técnicas para el estudio de <u>Rhizobium</u> "in vitro"	78
2.2.3.1. Crecimiento en medio sólido	78
2.2.3.2. Curvas de crecimiento	79
2.2.3.3. Efecto bactericida	79
2.2.3.4. Medidas de respiración	79
2.2.3.5. Análisis de RNA	82
2.2.3.6. Análisis de proteína	82
2.2.3.7. Capacidad de utilización de los herbicidas como fuente de carbono y energía	83
2.2.3.8. Resistencia a antibióticos	83
2.2.4. Técnicas para el estudio de la simbiosis <u>Rhizobium</u> -leguminosa	84

2.2.4.1. Obtención del inóculo de <u>Rhizobium</u>	84
2.2.4.2. Cultivo de plantas	85
2.2.4.3. Inoculación	86
2.2.4.4. Determinación de la actividad nitrogenosa en nódulos	87
3. RESULTADOS	89
3.1. Efectos de los herbicidas picloram y 3,6-D sobre la nitrificación	89
3.1.1. Efectos sobre la densidad de población nitrificante activa en cultivos suspensión de suelo	89
3.1.2. Efectos sobre la nitrificación de suelo en percolación	90
3.1.2.1. Efectos del picloram	92
3.1.2.2. Efectos del 3,6-D	105
3.1.3. Efectos en la viabilidad y evolución de la población nitrificante de suelo	113
3.1.4. Efectos en bacterias autotrofas nitrificantes en cultivo puro	115
3.2. Efectos de los herbicidas picloram y 3,6-D sobre <u>Rhizobium</u> spp.	125
3.2.1. Características de las cepas nativas utilizadas en los ensayos	125
3.2.2. Toxicidad de los herbicidas en medio sólido	126
3.2.3. Efectos en el crecimiento	129
3.2.4. Efectos en la viabilidad	139
3.2.5. Utilización de los herbicidas como fuente de	

## 1. I N T R O D U C C I O N

### 1.1. Los plaguicidas

Los plaguicidas son productos químicos, en su mayoría orgánicos, amplia y crecientemente utilizados en agricultura para reducir las elevadas pérdidas registradas en la producción agrícola a causa de las malas hierbas, los ataques de insectos, ácaros y nematodos y las enfermedades bacterianas y de hongos.

La evaluación de tales pérdidas es difícil, ya que la información sobre las producidas por cada uno de los citados agentes es muy desigual, al considerar los distintos cultivos y zonas. Una evaluación global sólo puede hacerse dentro de muy amplios límites e inevitablemente está sujeta a considerable incertidumbre. Las estimaciones de Cramer (1967) y la FAO (1967), dadas independientemente, coinciden en señalar que alrededor del 35% de la valoración total de la producción agrícola puede ser considerada como pérdida global en la que inciden los tres grupos de agentes, plagas, enfermedades y malas hierbas, en una proporción aproximadamente igual. Probablemente este porcentaje sería inferior al referirnos a los cultivos de las regiones templadas, donde el daño producido en las cosechas por plagas y enfermedades es notablemente inferior al que se produce en las zonas tropicales.

Según Bommer (1976), durante los próximos diez años - la producción de alimentos deberá ser incrementada en un 100% a

fin de responder a las previsibles necesidades mundiales, por lo que la protección de los cultivos resulta ser de vital importancia, no sólo para aumentar los rendimientos unitarios, sino también para mejorar la calidad de las producciones. Las predicciones, por lo tanto, apuntan a una progresiva expansión del consumo de plaguicidas, estimándose que en la próxima década de los años 80 la demanda será de 1,3-1,6 veces superior a la alcanzada en la década de los 70 (Roberts, 1975).

Las malas hierbas son, quizás, la causa más importante de merma en el rendimiento de los cultivos. Entre otros efectos perjudiciales son de destacar: compiten con las plantas cultivadas, por el agua, sustancias nutritivas y luz; presentan, a veces, efectos de antagonismo respecto a las plantas cultivadas; aumentan los gastos de cultivo y recolección; deterioran la calidad de las producciones; reducen la masa y la calidad del forraje a disposición del ganado; pueden dar cobijo, en algunas fases de su desarrollo, a plagas y enfermedades de las plantas cultivadas, contribuyendo de esta manera a su propagación.

Por todo lo expuesto, presenta gran interés económico - la lucha contra las malas hierbas, que tan notablemente perjudican a los cultivos, y dentro de esta lucha hay que destacar la creciente utilización de herbicidas en la agricultura moderna. En el Reino Unido datos referentes al año 1973 (Stansfield, 1974) - dan 8.300 Tm de producto herbicida activo aplicado en 4,15 millones de hectáreas de terreno, lo que equivaldría a una concentración de 30 ppm de producto herbicida introducido en el suelo, si

la anterior superficie se tratase homogéneamente hasta una profundidad de 0,5 cm. Según Gournay (1976), en los países agrícolamente desarrollados, las pérdidas producidas en los cultivos por malas hierbas representan alrededor del 10% del valor del producto recolectado. En Francia, según el mismo autor, la inversión en herbicidas es igual o aún superior a la inversión realizada en el resto de los plaguicidas.

La introducción de los herbicidas hormonales ha contribuido poderosamente al desarrollo de la lucha química contra las malas hierbas y su aplicación a la escarda química de los cereales ha llegado a ser una operación más entre las prácticas de su cultivo (Graham-Bryce, 1976). En España, el uso de los herbicidas es habitual en las explotaciones racionales, por ejemplo, son aplicados en más del 40% de la superficie dedicada a cereales y en el caso del maíz se llega casi a un 80%.

#### 1.1.1. Herbicidas y grupos principales

Puede decirse que en 1941 comienza la historia moderna de los herbicidas con la síntesis del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y su posterior utilización como herbicida. Este compuesto fue el primer herbicida orgánico efectivo a bajos niveles y no tóxico para los mamíferos (Blackman, 1945). Su descubrimiento ha revolucionado la agricultura, ya que a partir de su éxito el desarrollo de la investigación de nuevos productos herbicidas crece en proporciones geométricas.

Los compuestos orgánicos que presentan propiedades herbi

cidas se encuentran en muy distintos grupos químicos. Un criterio de clasificación según la estructura química es útil y puede establecer ciertos patrones de modo de acción en el vegetal, aun que se presentan numerosas excepciones. Quizá este criterio de a grupación sea el más extendido y menos conflictivo.

Los principales grupos químicos (Muzik y García Baudín, 1971; Bailly y Dubois, 1978) son:

- Compuestos fenólicos
- Fenoxiácidos
- Derivados de ácido carbámico
- Derivados de urea
- Diazinas
- Triazinas
- Amidas
- Dipiridilos
- Benzonitrilos
- Derivados de anilina
- Triazoles
- Varios: Derivados del ácido benzoico
  - " del oxidiazol
  - " de benzofurano
  - " piridínicos

Los herbicidas estudiados en el presente trabajo son de rivados de piridina, los cuales constituyen un grupo en la ante rior clasificación; pero considerando su modo de acción en el ve-

getal, algunos de ellos entre los que se encuentran los dos objeto de estudio, picloram y 3,6-D, presentan actividad hormonal "tipo auxina" semejante a los fenoxiácidos.

En el siguiente apartado pasaremos a considerar el conjunto de los herbicidas hormonales con acción auxina.

#### 1.1.1.1. Herbicidas hormonales tipo auxina

Después del descubrimiento de las auxinas, fitohormonas o sustancias naturales reguladores del crecimiento vegetativo y de otras funciones en la planta, se obtuvieron por síntesis química diversos compuestos con carácter herbicida selectivo, que producían efectos semejantes a los de las auxinas en la morfología y fisiología de las plantas susceptibles. Las alteraciones en el vegetal son debidas a la persistencia de la acción auxina.

#### Sus efectos en las plantas

Su acción se extiende desde el lugar de contacto a distintas partes del vegetal produciendo, principalmente, las siguientes alteraciones:

- En el crecimiento: Elongación celular y proliferación de tejidos, inducción de raíces adventicias, epinastia en hojas y otros órganos.

- En el metabolismo: alteración de la actividad respiratoria, disminución de las reservas de almidón y aumento de azúca-

res, reducción más o menos acentuada de la fotosíntesis, alteraciones en el metabolismo de ácidos nucleicos, en la distribución de fósforo y aminoácidos y disminución de la absorción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ .

### Grupos

Como herbicidas hormonales del tipo auxina se consideran los siguientes grupos, según su estructura química, (Corbett, 1974; Moore, 1979); presentándose dentro de ellos algunas propiedades generales comunes:

a) Fenoxiácidos y compuestos relacionados: son auxinas persistentes en la planta, de potente eficacia. Los fenoxiácidos son específicamente llamados herbicidas hormonales. Se agrupan según el ácido del que derivan:

- Ácidos fenoxiacéticos: 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4-DEP, MCPA
- Ácidos fenoxipropiónicos: mecoprop (2,4-MCPP), dicloroprop (2,4-DP), fenoprop (2,4,5-TP), y erbon.
- Ácidos fenoxibutíricos: MCPB, 2,4-DB
- Compuestos relacionados: clorfenac

b) Ácidos derivados del naftaleno: Ácido naftalenacético y ácido metilnaftoxiacético.

c) Derivados del ácido benzoico y compuestos relacionados: solamente algunos derivados del ácido benzoico, entre muchos

que son herbicidas, presentan actividad auxina (Audus, 1976), - siendo, sobre todo, los derivados clorados los de más potente acción de este tipo, favorecida por su gran persistencia en la planta (Keitt y Baker, 1966). Los principales son: dicamba, 2,3,6-TBA y cloramben.

Por otra parte, otros compuestos herbicidas, con acción auxina, como el cloruro de triclorobencilo, se consideran relacionados con el ácido benzoico (Martin, 1972), pudiendo ser debida - su acción a su conversión en el citado ácido.

d) Benazolin (ácido 4-cloro-2-oxobenzotiazolin-3-acético): su efecto herbicida es probablemente debido a su acción como auxina (Leafe, 1964), ya que estructuras químicas relacionadas con él y sin acción hormonal de este tipo no resultaron herbicidas (Brookes y Leafe, 1963).

e) Derivados de piridina: hasta ahora pocos compuestos de este tipo se han empleado como herbicidas y de ellos picloram y 3,6-D, de los que nos ocuparemos en el apartado 1.1.1.2., presentan reconocida acción auxina en el vegetal. Otros herbicidas de este grupo son: pyriclor y triclopyr.

#### Modo de acción

Muchos autores apoyan la teoría de la acción de las auxinas a nivel de gen, estimulando la producción de RNA (Moore, - 1979).

Así la actividad herbicida de 2,4-D se atribuye a cambios en el RNA y la síntesis de proteínas y la respuesta bioquímica pudiera ser iniciada en la membrana plasmática (Ashton y Crafts, 1973). Hardin y col. (1972) encuentran que un factor transcripcional se libera de membranas aisladas de células de soja en presencia de 2,4-D, pero no de su análogo inactivo 3,5-D.

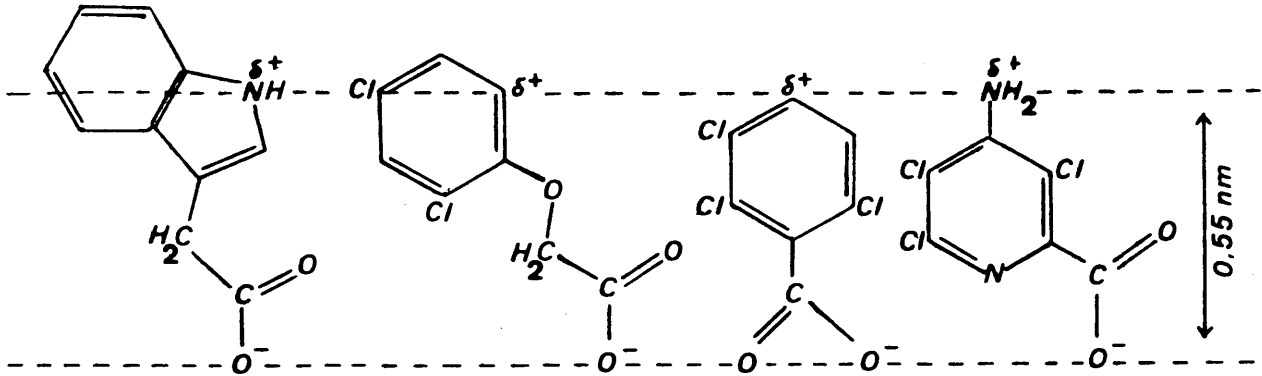
Ante la rapidez de respuesta del vegetal a las auxinas y las experiencias con inhibidores, parece probable la existencia de un lugar o lugares de acción específicos para la auxina en el vegetal (Moore, 1979). Según Hardin y col. (1972), un receptor asociado a la membrana plasmática podría, simultáneamente, provocar la respuesta inmediata en el crecimiento y la posterior respuesta nuclear característica.

Los herbicidas tipo auxina afectan, por otra parte, marcadamente la permeabilidad de la membrana celular reflejándose en el transporte iónico (Ashton y Crafts, 1973).

#### Relación estructura-actividad

Se han intentado establecer los requerimientos estructurales para la actividad auxina pero los resultados no han sido concluyentes ya que, a menudo, el descubrimiento de una nueva auxina invalida la hipótesis antes emitida. La más satisfactoria es, probablemente, la de Porter y Thimann (1965) y Thimann (1969), en la que se sugiere que la actividad auxina depende de la presencia de una carga positiva fraccional situada aproximadamente a 0,55 nm

de la negativa de un grupo carboxilo. El diagrama siguiente muestra este requerimiento en el IAA, 2,4-D, 2,3,6-TBA y picloram.



La sustitución del H por Cl en la posición 6 del 2,4-D, así como en la 4 de los derivados benzoicos, elimina la actividad auxina, presumiéndose que se inhabilita así su combinación con el probable lugar de acción en la planta. Sin embargo, la actividad auxina de algunos compuestos, como cloramben, no encaja dentro de esta teoría (Thimann, 1969).

#### 1.1.1.2. Herbicidas hormonales tipo auxina derivados de piridina

PICLORAM: Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

#### Efectos en plantas

Aunque el picloram es estructuralmente distinto de otros compuestos con actividad auxina, Kefford y Caso (1966) y Eisinger y Morré (1971), entre otros autores, citan sus propiedades de auxina. Así, el picloram, aparte de otros síntomas típicos, estimu

la la elongación celular de una amplia variedad de tejidos vegetales, produce epinastia y conduce a la pérdida de clorofila.

Es uno de los compuestos herbicidas de más potente acción sobre el crecimiento vegetal, produciendo una amplia alteración en la planta debido a su gran movilidad en la misma. El picloram no interrumpe inmediatamente el sistema de captura y traslocación del vegetal, efecto que es consecuente con su acción como auxina (Davis y col., 1972).

También se ha observado que actúa como una auxina sobre algunos procesos bioquímicos. Así, inhibe la captura de  $O_2$  (Foy y Penner, 1965) e incrementa el contenido de ácidos nucleicos, sobre todo, en las plantas sensibles (Malhotra y Hanson, 1970; Chen y col., 1972).

La mayoría de las dicotiledóneas, excepto las crucíferas, son sensibles al picloram, sin embargo, éste presenta sólo moderada toxicidad en las gramíneas. A concentraciones herbicidas, el picloram causa, en las plantas susceptibles, alteraciones en el crecimiento semejantes a las causadas por 2,4-D y 2,4,5-T (Hamerker y col., 1963), pero es, en general, un herbicida más selectivo en su acción sobre las distintas especies.

#### Utilización como herbicida

El picloram es un potente herbicida de post-emergencia utilizado para el control de muchas especies de árboles, arbustos

y plantas herbáceas dicotiledóneas, mostrando selectividad entre especies.

Es muy efectivo contra malas hierbas perennes de raíz profunda como Cirsium arvense (Vanden Born, 1969), Polygonum convolvulus (Friesen, 1965; Molberg, 1965) y otras y en la erradicación de una gran variedad de plantas arbóreas (Dickens y Fears, 1977; Coartney, 1977) y malas hierbas nocivas en prados y pastizales (Gantz y Laning, 1963; Scifres y col., 1977).

A pesar de que las gramíneas son relativamente tolerantes a este herbicida, existen dificultades para su empleo en el desherbaje de cereales, ya que, a la dosis permitida por el cultivo, las plantas vivaces, a veces, son poco afectadas (Alfaro, 1974). Presenta, además, el inconveniente de su persistencia en el suelo y en mezclas de suelo que contienen una fuerte proporción de pajas procedentes de cultivos tratados (Vallée y col., 1975). Así, el control prolongado de las especies perennes en la tierra de labor viene limitado por la persistencia del picloram en suelo y la susceptibilidad de cultivos tales como trigo (Triticum aestivum) y otros no cereales, a cantidades muy pequeñas de este herbicida (Nalewaja, 1970). Sin embargo, la aplicación inicial de 0,07 ó 4,48 kg/Ha puede ser utilizada en avena o cebada y en tierra de barbecho respectivamente, sin dañar el trigo de la siguiente cosecha (Keys y Friesen, 1968; Ragab, 1975). La aplicación a cultivos de cereal suele hacerse conjuntamente con otros herbicidas.

La eliminación de malas hierbas en pastos es de gran

interés: en el conjunto de la economía nacional es importante el mantenimiento de una composición adecuada de plantas herbáceas - aptas para el pastoreo, evitando la conversión de la pradera en jaral o en monte bajo. Por ejemplo, en el caso de recuperación - de una pradera invadida por "tojo" la utilización de herbicidas, tales como 2,4,5-T y picloram, junto a un abonado conveniente, - ha dado muy buenos resultados (Arroyo, 1971).

El uso del picloram está muy extendido para desherbaje total en terrenos sin cultivo a razón de 0,5-1,2 Kg/Ha. Se aplica también conjuntamente con otros herbicidas en la roturación - de terrenos.

#### Degradabilidad y persistencia en el suelo

Se trata de un compuesto no volátil y muy persistente en la planta y el suelo, en este último tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, dependiendo su degradación de la acción de microorganismos (Hance, 1967).

Se conoce poco acerca de su degradación. El único metabolito detectado en suelo ha sido el 6-hidroxiderivado. Aunque se ha obtenido  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de picloram marcado en su totalidad - con  $^{14}\text{C}$  (Redemann y col., 1968), no hay evidencia de descarboxilación como se ha comprobado en plantas. Su rotura en el suelo libera gran cantidad de cloro inorgánico, y el 6-hidroxipicloram - no se acumula en el suelo en más del 1% del picloram añadido. Se sugiere que en condiciones aeróbicas una dioxigenasa rompe el a-

nillo de piridina, tal como ocurre en la degradación de la vitamina B<sub>6</sub> y el ácido nicotínico (Meikle y col., 1974).

Se ha estudiado la susceptibilidad al ataque microbiano de los derivados de piridina, deduciéndose su dependencia del tipo, posición y número de sustituyentes del heterociclo (Naik y col., 1972).

El picloram es considerado como un herbicida de gran persistencia en el suelo, variable según la dosis de aplicación, la naturaleza del suelo y las condiciones climáticas (Grover, 1967; Keys y Friesen, 1968; Baur y col., 1972). Los resultados de estudios de persistencia, con procedimientos y condiciones experimentales distintos, asignan desde 71 hasta más de 400 días de permanencia en los distintos suelos frente al máximo de 30 días a 1 año del dicamba (Altom y Stritzke, 1973). El picloram es más persistente que 2,4-D, 2,4,5-T, 2,3,6-TBA y dicamba, siendo su desaparición del suelo debida principalmente a la lixiviación (Keys y Friesen, 1968 y Burnside y col., 1971).

3,6-D: Acido 3,6-dicloropicolínico

#### Efectos en plantas

Es un herbicida de potente acción sobre el crecimiento vegetal induciendo en el mismo respuestas tipo auxina, semejantes a las causadas por su análogo estructural picloram. Así, produce severa epinastia y anastomosis en ciertos órganos (Naish, 1975).

Es absorbido por hojas y raíz y traslocado con gran rapidez a través del vegetal, ejerciendo un mayor efecto en plantas jóvenes en activo crecimiento; mientras, en condiciones desfavorables al mismo, los efectos se manifiestan lentamente (Morel, 1977).

Ha sido observado aumento del contenido de RNA y proteína en hipocotilo de soja tratado con este compuesto (Chen y Lin, 1977).

### Utilización como herbicida

El 3,6-D es un herbicida de post-emergencia con la particularidad, respecto a otros de tipo auxina, de su efectividad sobre especies de compuestas muy resistentes. Es, también, muy efectivo sobre malas hierbas perennes de raíz profunda como Polygonum spp. (Brown y Uprichard, 1976). Se ha encontrado útil su aplicación, en general, en cultivos de gramíneas y crucíferas, como maíz, sorgo, lino, cereales y colza (Morel, 1977).

Por el restringido espectro de especies vegetales sensibles a él, se aplica en combinación con fenoxiherbicidas a dosis aproximadamente de 0,1 Kg/Ha, con amplio margen de seguridad tanto para el cultivo de cereal de invierno como de primavera, presentando, particularmente el cereal, tolerancia al herbicida en cualquiera de las etapas de su crecimiento (Brown y Uprichard, 1976). Hasta 0,2 Kg/Ha es aplicado en cultivos de colza conjuntamente con otros herbicidas. Dosis mucho mayores se utilizan para el control de malas hierbas en tierras en barbecho.

## Degradabilidad y persistencia

La diferencia esencial entre 3,6-D y picloram es la mayor susceptibilidad del primero a la degradación, siendo así, debido a su menor persistencia en suelo, más útil para la aplicación en tierras de cultivo.

No se ha encontrado aún que sea metabolizado en las - plantas, sin embargo, estudios en distintos tipos de suelo revelan su carácter biodegradable, convirtiéndose en CO<sub>2</sub>, antes de - 100 días, el 50% del producto activo y habiéndose detectado el - 6-hidroxiderivado en suelo como en el caso de picloram (Brown y Uprichard, 1976).

El 3,6-D es eliminado del suelo, además de por degradación microbiana, por lixiviación, ya que en la mayoría de los suelos de pH por encima de la neutralidad, este compuesto se halla - en forma iónica (Pik y col., 1977).

### 1.2. Interacción plaguicida-medio ambiente

De las operaciones que requiere la protección de los - cultivos, así como de otras muchas actividades del hombre, se deriva un posible daño en el medio ambiente, lo que ha suscitado un creciente interés acerca de los efectos de productos químicos sobre el suelo y su equilibrio biológico. En el contexto agrícola, interesaría conocer los efectos sobre la microflora del suelo como determinante de su fertilidad, ya que los microorganismos es-

5306074352

tán íntimamente ligados a procesos tales como el reciclado de los nutrientes esenciales para las plantas, descomposición y formación de humus, estabilidad estructural del suelo, supervivencia de patógenos y otros. Asimismo, la degradación de productos plaguicidas es, principalmente, debida a la acción de microorganismos. El funcionamiento eficaz de estos procesos requiere un delicado equilibrio entre los microorganismos, el suelo y las plantas, en el cual influyen muchos factores ambientales y del que resulta un estado conocido como fertilidad del suelo. Es claro que el aporte de un compuesto químico al suelo podría alterar este equilibrio: alrededor de la mitad de los compuestos herbicidas son directamente aplicados al suelo, además de que los de aplicación foliar, eventualmente, también llegarían al mismo. Por otra parte, tanto las pulverizaciones agrícolas como los productos volátiles pueden llegar a horizontes superiores del suelo, lejos del lugar de aplicación, siendo además, el agua, en ocasiones, el vector de estos productos a larga distancia.

Después del agua, el nitrógeno es el componente limitante de la producción más importante en agricultura y es particularmente crítico en la producción de alimentos de alto contenido en proteína. La necesidad de poner a disposición de la cadena alimentaria mayor cantidad de nitrógeno es evidente, y por tanto, fundamental el evitar las pérdidas que puedan producirse, sobre todo, en el suelo o proteger, por otra parte, su entrada en el mismo.

Los procesos de reciclado del nitrógeno en la naturaleza

y, en particular los que tienen lugar en el suelo, son del máximo interés, no sólo ante consideraciones de necesidad de mantenimiento de la fertilidad, sino porque el suelo es el sustrato más importante de los procesos, fundamentalmente biológicos, implicados en el reciclado de este elemento.

Posteriormente expondremos los aspectos fundamentales del Ciclo del Nitrógeno y la importancia que tienen en el mismo, los procesos de nitrificación y fijación biológica de nitrógeno.

### 1.3. Ciclo del Nitrógeno

La secuencia compleja de reacciones implicadas en el Ciclo del Nitrógeno supone actividades metabólicas de organismos vivos y adicionalmente incluye importantes conversiones abiológicas de nitrógeno.

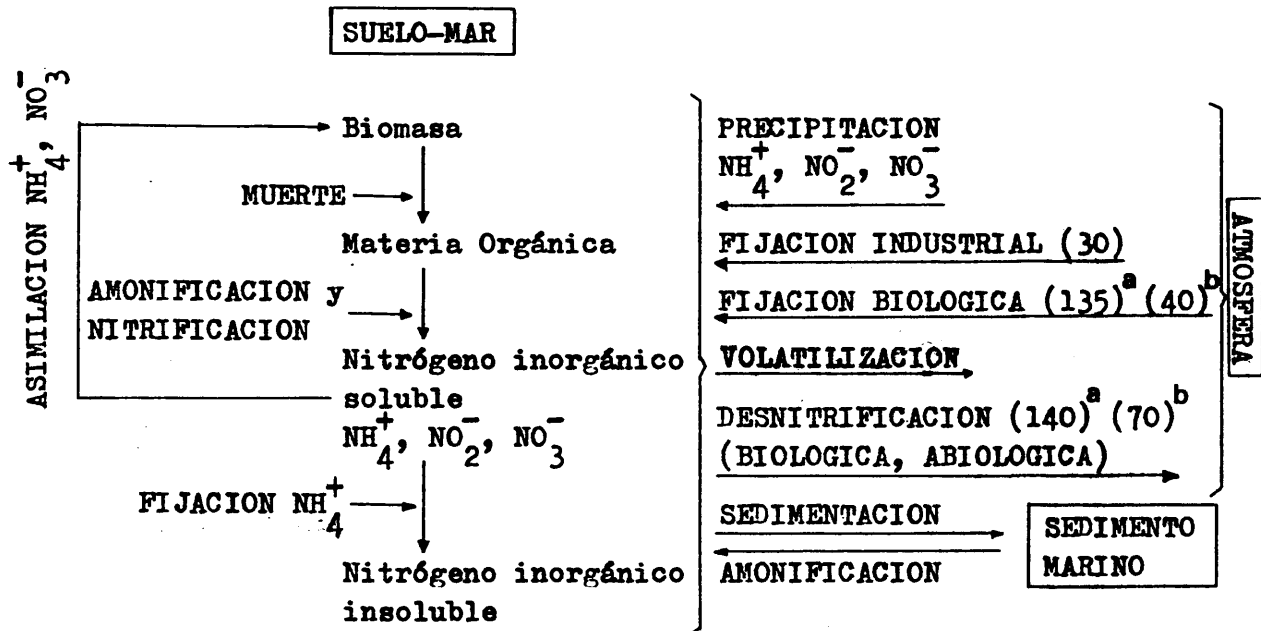
En el movimiento global de este elemento se pueden considerar dos grandes subciclos: Ciclo Fijación  $N_2$ -Desnitrificación y Ciclo de Volatilización-Precipitación; el primero es de carácter fundamentalmente biológico y el segundo abiológico. En la atmósfera los dos ciclos parecen funcionar independientemente, pero en el "pool" suelo-agua pierden la independencia y tienden al equilibrio a través de compuestos intermedios comunes.

El "pool" suelo-agua es, claramente, el centro dinámico del Ciclo del Nitrógeno, por la magnitud y variedad de las conversiones que tienen lugar en él, principalmente las mediadas por

organismos vivos (ver esquema). Así, el mantenimiento de un cierto estado de equilibrio estable en este "pool" se debe, fundamentalmente, a los procesos de fijación de  $N_2$ , nitrificación y desnitrificación, llevados a cabo por microorganismos y que, por otra parte, son cruciales en el reciclado global de este elemento.

Las reacciones biológicas implicadas en el Ciclo del Nitrógeno presentan dos tipos principales de actividad: reacciones relacionadas con la síntesis de material celular y reacciones relacionadas con la obtención de energía. Entre las primeras, la fijación de  $N_2$  es el único proceso biológico que aporta nitrógeno al "pool" suelo-agua. En las segundas se incluyen la nitrificación y desnitrificación.

Interconversiones de nitrógeno en el "pool" suelo-agua y su relación con la atmósfera.



Las cifras son millones de Tm por año. a) Suelo. b) Mar.

En la nitrificación el nitrógeno funciona como reductor, produciéndose nitrato. Por el contrario en la desnitrificación - funciona como oxidante, siendo la secuencia de sus reacciones el caso especial de utilización de nitrato disimilatoria, que conduce a la formación de compuestos de nitrógeno gaseosos ( $N_2O$  y  $N_2$ ) que pasan a la atmósfera.

La nitrificación y desnitrificación son pasos forzados en la vía del nitrógeno hacia y desde el "pool" suelo-agua, y - - constituyen para los principales organismos que llevan a cabo estos procesos la forma normal de obtención de energía.

La estimación cuantitativa de algunos procesos del Ciclo del Nitrógeno viene dada en el anterior esquema. En este aspecto, la significación de la nitrificación puede reflejarse en los valores correspondientes a la desnitrificación, ya que este último proceso es, en gran medida, de carácter biológico y dependiente, en parte, del aporte de sustrato energético resultante de la nitrificación.

### 1.3.1. Nitrificación

La nitrificación es la transformación biológica de compuestos de nitrógeno inorgánicos u orgánicos desde un estado reducido a otro más oxidado (Alexander y col., 1960). Otras definiciones más restrictivas se refieren a la oxidación biológica de nitrógeno en forma de sal de amonio a nitrato.

Desde el punto de vista agronómico la nitrificación ha sido considerada durante mucho tiempo como un proceso microbiológico beneficioso en virtud de su contribución al mantenimiento de la fertilidad del suelo, pero hoy día la opinión general parece inclinarse al lado opuesto, ante el hecho de que las plantas difieren considerablemente en el grado de captura de las dos formas de nitrógeno, amonio y nitrato (Viets, 1965).

En periodos de oxidación activa de  $\text{NH}_4^+$ , el  $\text{NO}_3^-$  no absorbido por las plantas o inmovilizado por la microflora, puede ser eliminado del suelo por ser una forma de nitrógeno fácilmente lixiviable. Quizá ésta sea la principal causa de la baja recuperación del nitrógeno fertilizante (Allison, 1966; Prasad y col., 1971). Además la nitrificación puede ser favorecedora de la pérdida de nitrógeno por el suelo, como proceso que suministra sustrato ( $\text{NO}_3^-$  ó  $\text{NO}_2^-$ ) a la microflora desnitrificante, la cual actúa vigorosamente en la mayoría de los suelos en condiciones anaeróbicas, favorecidas, también, por el consumo de  $\text{O}_2$  llevado a cabo por los nitrificantes (Greenland, 1958; Burns y Hardy, 1975).

Por otra parte, la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por  $\text{NO}_3^-$ , con riesgo para la salud y contribución a la eutroficación, es otro aspecto negativo de la nitrificación o del excesivo uso de fertilizantes nitrogenados (Alexander, 1977).

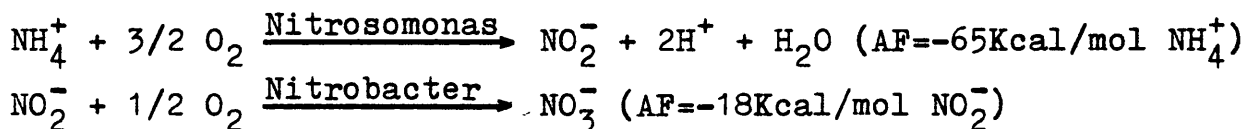
A pesar de todo, las consecuencias de la nitrificación no están precisadas cuantitativamente y por tanto, el alcance de su beneficio o perjuicio no está claro.

### 1.3.1.1. Nitrificación y microorganismos nitrificantes

Las reacciones de nitrificación parecen ser las principales funciones metabólicas sólo en las bacterias autotrofas, incluidas, según el manual de Bergey, (Buchanan y Gibbons, 1974) en la familia Nitrobacteriaceae con siete géneros, de los cuales dos son marinos y capaces de oxidar únicamente  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ .

Estas bacterias nitrificantes se dividen en dos grupos: las oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  y las oxidantes de  $\text{NO}_2^-$ , no siendo ninguna capaz de llevar a cabo las dos reacciones. Del primer tipo, Nitrosomonas parece ser el género más extendido, seguido de Nitrosopira y Nitrosobolus y como oxidador de  $\text{NO}_2^-$  más frecuente está Nitrobacter. Las especies de más amplia distribución son Nitrosomonas europaea y Nitrobacter agilis o N. winogradskyi.

Estas bacterias autotrofas obtienen la energía necesaria de la oxidación del nitrógeno, según las siguientes reacciones (Aleem, 1970):



Un amplio número de microorganismos heterotrofos, incluidas ciertas bacterias, actinomicetos y hongos, son capaces, también, de oxidación, aunque limitada, de compuestos nitrogenados, pero su contribución al proceso de nitrificación se cree que es menor.

Los compuestos nitrogenados oxidados por los heterotrofos pueden ser tanto inorgánicos como orgánicos, presentándose en estos últimos el nitrógeno en el estado reducido de  $R-NH_2$  o, incluso, en uno más oxidado.

Las cantidades oxidadas por los heterotrofos son mínimas comparadas con las de los anteriores autotrofos (2000 ppm o más, transformadas por Nitrosomonas spp. frente a las 100 ppm de Aspergillus flavus). Así, ciertas bacterias y actinomicetos heterotrofos, cultivados en presencia de sales de  $NH_4^+$ , fueron capaces de generar únicamente  $NO_2^-$  (Hirsch y col., 1961; Verstraete y Alexander, 1972; Witzel y Overbeck, 1979), el cual aparecía al cesar la fase de crecimiento activo cuando el  $NH_4^+$  no era ya necesario en la asimilación (Brisou y Vargues, 1962; Obaton y col., 1968; Verstraete y Alexander, 1972). Estos organismos no llegan a producir  $NO_3^-$ , encontrándose sólo algunas especies de hongos que lo formaron a partir de  $NO_2^-$ . Por otra parte, algunos géneros de bacterias, como Arthrobacter, y de hongos, como Aspergillus, son capaces de producir  $NO_3^-$  a partir de  $NH_4^+$ , formándose, en el caso de los hongos,  $NO_2^-$  como producto intermedio (Marshall y Alexander, 1962).

La significación de la nitrificación heterotrofa en el suelo está aún por evaluar. Hasta ahora es evidente que la nitrificación en la mayoría de los casos no implica a microorganismos heterotrofos, aunque sí puede ser importante en ciertos habitats, como suelos ácidos, en los que el proceso de nitrificación es aún poco claro. Weber y Gainey (1962) observaron producción de  $NO_3^-$  en suelo suplementado con  $SO_4(NH_4)_2$ , incluso a pH menor de 4, mien-

tras en otros la aplicación de este compuesto inhibió la nitrificación. Ishaque y Cornfield (1976) refieren nitrificación en suelo a pH 4,2 en ausencia de bacterias quimioautotrofas, pero sin lograr el aislamiento de los posibles heterotrofos responsables. En algunos trabajos es referida la existencia de inhibidores que no impiden la producción de  $\text{NO}_3^-$  a partir de N-humus pero sí de  $\text{NH}_4^+$ , revelando, así, dos tipos de poblaciones nitrificantes.

Por otra parte, los estudios en cultivo puro muestran la lenta y limitada nitrificación por heterotrofos, aunque su ineficacia podría ser compensada por su gran número en el suelo, pudiéndose pensar, a la vista de su densidad, que los heterotrofos nitrificantes juegan un papel, aunque secundario, en el proceso de nitrificación con rendimiento mucho menor que el de las bacterias autotrofas.

#### 1.3.1.2. Nitrificación e influencias ambientales

Tanto factores químicos como físicos afectan el grado de oxidación de  $\text{NH}_4^+$  en el suelo: la nitrificación presenta una gran sensibilidad a las influencias externas, que es atribuible, en parte, a la gran similitud fisiológica de las especies responsables, con notorio resultado en la formación de producto final.

Entre las propiedades fisicoquímicas del habitat microbiológico que afectan el grado de nitrificación están:

La disponibilidad de nutrientes. Asumiendo que la nitrificación se trata fundamentalmente de un proceso autotrófico sería - -

improbable que otro factor, distinto del sustrato energético, fue se limitante del proceso, ante el escaso material celular formado como consecuencia directa de la nitrificación. Sólo el  $\text{NH}_4^+$  no soluble o el químicamente extraíble es directamente accesible para ser oxidado por los autotrofos nitrificantes, ya que su habilidad para utilizar el  $\text{NH}_4^+$  fijado no parece tan efectiva como la de muchas especies heterotrofas (Jansson, 1958). Por otra parte, la sensibilidad de los nitrificantes autotrofos, especialmente de Nitrobacter, a la presencia de grandes cantidades de urea,  $\text{NH}_3$  o sales de amonio en suelos de alto pH, o que resultan con alto pH como consecuencia de la adición de cualquiera de los dos primeros compuestos, parece ser resultado de la inhibición de la bacteria por amoniaco libre más que por efecto del ión  $\text{NH}_4^+$  (Aleem y Alexander, 1960; Dommerges y Mangenot, 1970).

Los productos finales,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , también, afectan a las bacterias nitrificantes autotrofas. Sin embargo, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  tóxica raramente es alcanzada en el suelo y el  $\text{NO}_2^-$ , tóxico sólo en Nitrosomonas, reduce la actividad de éstas únicamente a pH bajo (Lewis y Pramer, 1958) y por otra parte el nitrito no persistiría en suelos ácidos.

El pH. Es considerado como el principal entre los factores ecológicos de influencia en la nitrificación. Es un hecho conocido que en suelos ácidos la nitrificación procede muy lentamente, aún en presencia de adecuadas cantidades de sustrato y que los organismos nitrificantes son escasos o no aparecen en ambientes muy ácidos. Así, la acidez determina no sólo la actividad sino

también el tipo y densidad de la población nitrificante. Bhuiya y Walker (1977) detectaron autotrofos oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  en varios suelos moderadamente ácidos (pH 5,0) aislando cepas de Nitrosobolus, Nitrosomonas y Nitrospira. A partir de suelos aún más ácidos Walker y Wickramasinghe (1979) obtuvieron, en cultivo puro, especies de oxidantes de  $\text{NH}_4^+$ , pero no lograron aislar los oxidantes de  $\text{NO}_2^-$ , los cuales habían sido detectados en varios suelos. Estos mismos autores tampoco consiguieron el aislamiento de bacterias autotrofas en los suelos ácidos estudiados por Ishaque y Cornfield (1976).

En general, la actividad de los nitrificantes autotrofos disminuye considerablemente por debajo de pH 6 y es despreciable por debajo de 5 (Dancer y col., 1973). La nitrificación a pH menor, observada en algunos suelos, es atribuible a cepas de bacterias autotrofas adaptadas o a la existencia de diferencias químicas dentro del hábitat. Así, dependiendo de la procedencia de los aislamientos (pH del suelo de origen) el pH óptimo podría variar para las distintas cepas, pero se puede generalizar que la actividad máxima de la mayoría de los autotrofos oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  se encuentra por encima de la neutralidad y la de los oxidantes de  $\text{NO}_2^-$  próxima a ella (Morrill y Dawson, 1962). - Hay que tener en cuenta que, con frecuencia, los microorganismos ocupan lugares microecológicos de acidez diferente a la supuesta según las determinaciones obtenidas a partir de muestras de suelo, las cuales incluyen muchos microambientes.

A diferencia de la nitrificación autotrofa la heterotrofa no va ligada al crecimiento. Por ejemplo, la actividad nitrificante de Aspergillus flavus requiere condiciones neutras o alcalinas, aunque el hongo crezca bien en medio ácido; la inhibición por acidez se debería a la acción sobre los sistemas enzimáticos responsables de la oxidación de los compuestos de nitrógeno (Hirsch y col., 1961). Sin embargo, otros heterotrofos nitrifican a bajo pH y, aún más, la formación de  $\text{NO}_3^-$  en algunos suelos ácidos se atribuye a nitrificación heterotrofa, que conduce fundamentalmente a  $\text{NO}_2^-$  pasando éste a  $\text{NO}_3^-$  abiológicamente (Tyler y Broadbent, 1960; Ishaque y Cornfield, 1976).

Tensión de oxígeno. Tanto las especies nitrificantes autotrofas como las heterotrofas son aerobias (Alexander, 1965b), siendo la tensión óptima de  $\text{O}_2$  para una activa producción de nitrato similar a la del aire (Grechin y Ch'eng, 1960).

Las bacterias autotrofas nitrificantes muestran alta afinidad por el oxígeno, pudiendo ocurrir la nitrificación a concentraciones tan bajas como  $6 \mu\text{M}$  de oxígeno y no requiriendo así altos grados de aireación ante la baja demanda de este elemento por Nitrosomonas y Nitrobacter (1,5 y 0,5 moles respectivamente para la oxidación de 1 mol de sustrato energético).

Son muchos los factores edafológicos y climatológicos - que afectan la aireación, constituyendo el agua del suelo la principal barrera de accesibilidad del oxígeno a los microorganismos. Se ha considerado que contenidos en agua entre  $1/2$  y  $2/3$  de la -

capacidad de campo muestran un grado óptimo de humedad del suelo - para una buena aireación. En suelos encharcados o sedimentos, la nitrificación está limitada por el grado de difusión de oxígeno y, dependiendo del contenido de materia orgánica del suelo, por la mayor o menor demanda de oxígeno por parte de la flora heterotrofa - (Vanderborght y Billen, 1975). Sin embargo, los nitrificantes autotrofos pueden sobrevivir en ambientes anóxicos largos periodos de tiempo, aunque no puedan crecer (Painter, 1970).

Temperatura. La nitrificación transcurre entre los 5 y 40°C. Fuera de estos límites algunos investigadores han encontrado actividad, aunque muy baja (Frederick, 1956). A pesar de las diferencias según las especies, el óptimo se ha establecido entre los 30 y 35°C para Nitrosomonas y 34-35°C para Nitrobacter (Deepe y Engel, 1960; Alexander, 1977), desconociéndose la existencia de especies nitrificantes autotrofas termófilas.

Materia orgánica. Los autotrofos presentan sensibilidad a muchas - sustancias orgánicas e incapacidad para crecer sobre compuestos orgánicos suplementados exógenamente. En medio de cultivo, se han encontrado muchos compuestos orgánicos que les son inhibitorios. En contraste, llama la atención el hecho de que la nitrificación tenga lugar, también, en suelos ricos en materia orgánica y además, - los nitrificantes se adhieren a partículas de suelo, probablemente muchas de ellas orgánicas (Vanderborght y Billen, 1975), en los lugares donde el  $\text{NH}_4^+$  es accesible. Así, se han formulado diversas hipótesis, como la que postula que la bacteria en el suelo habita un ambiente particular distinto del medio de cultivo o incluso, la de

la existencia de una posible simbiosis autotrofos-heterotrofos.

Por otra parte, a menudo la materia orgánica que llega al suelo favorece el desarrollo de la flora heterotrofa y puede reducir o detener la formación de nitrato, lo cual puede obedecer a diversas causas como: la competitividad por el  $\text{NH}_4^+$  que conduciría a la inmovilización del nitrógeno por otra flora distinta de la nitrificante. Asimismo, podría ocurrir depleción de  $\text{O}_2$  en el suelo, condición desfavorable a la nitrificación y, por el contrario, favorecedora del proceso de desnitrificación. De todo ello resultaría reducción de la actividad nitrificante del suelo como consecuencia indirecta de la entrada de moléculas orgánicas en el mismo.

### 1.3.2. Fijación biológica de nitrógeno. La simbiosis Rhizobium-leguminosa

Entre los muchos factores que podrían contribuir a la mejora en el rendimiento de los cultivos, probablemente, los de mayor importancia sean los que incrementan la disponibilidad de nitrógeno. La producción industrial de fertilizantes nitrogenados, cada vez más insuficiente, requiere un gran gasto energético y supone un alto coste de producción. Dado, además, el bajo aprovechamiento de estos fertilizantes por los cultivos (por término medio un 50%) es de especial interés, a parte de otras alternativas tecnológicas, la alternativa de la fijación biológica de  $\text{N}_2$ .

Actualmente la principal fuente de alimento es el cereal de grano, con una producción mundial anual de alrededor de 1300 --

millones de toneladas (FAO, 1972), debido, sin duda, a la mejora en el rendimiento de su cultivo conseguida, en gran parte, gracias al empleo de fertilizantes: existe una directa correlación entre el incremento de su producción y el uso de fertilizantes nitrogenados. Por otra parte, la leguminosa grano tiene gran importancia como fuente proteínica, tanto para consumo humano como para alimentación del ganado, debido a su alto contenido en proteína 20-45% frente al 8-20% del cereal. La producción de grano de leguminosas supone sólo el 10% de la del cereal con un área de cultivo correspondiente al 15%, debido, quizá, a no haberse conseguido la mejora de su cultivo con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, además, los requerimientos en nitrógeno son cuatro veces superiores, por unidad de rendimiento, a los del cereal (Hardy y Havelka, 1975). Por todo esto, en el desarrollo y protección del aprovechamiento del nitrógeno por las leguminosas estaría la clave de la mejora de su producción y en este sentido es del máximo interés la capacidad fijadora de  $N_2$  del Rhizobium en simbiosis con las leguminosas.

La cantidad de  $N_2$  fijado biológicamente es difícil de evaluar por la heterogeneidad de los organismos fijadores, la de su distribución y ambiente en el que se desarrollan, así como por la limitación de datos base de que se dispone. Recientes estimaciones asignan la cantidad de 140 millones de Tm anuales de nitrógeno fijado biológicamente en el suelo, de los que unos 90 millones corresponden a suelos agrícolas, cifras de gran significación comparadas con las de otros procesos que aportan nitrógeno al suelo (ver el anterior esquema del apartado 1.3). Entre las diferentes formas de fijación biológica de nitrógeno existentes, libre, -

asociativa y simbiótica obligada, la última, representada fundamentalmente por la simbiosis Rhizobium-leguminosa, es de la máxima importancia en suelos agrícolas y no agrícolas. Se estima que contribuye anualmente con 35 millones de toneladas de nitrógeno fijado por los cultivos de leguminosas, incluidas las praderas temporales para pasto y otros fines, y ya que el área de cultivo de las leguminosas se cifra entre el 18 y 25% del total del suelo cultivado - se podría decir que los campos de leguminosas son lugares con grados de fijación muy superiores a los de otras formas de fijación biológica de  $N_2$ .

En las praderas permanentes y pastizales son fijados -- otros 40 millones de toneladas de nitrógeno, en gran parte, atribuidos a la simbiosis Rhizobium-leguminosa, ya que estos suelos albergan una amplia gama de especies de leguminosas silvestres. Asimismo, la introducción en los pastos a gran escala de leguminosas de importancia comercial tiene ya considerable éxito (Burns y Hardy, 1975).

Las leguminosas arbóreas, también, presentan apreciable, - aunque lenta, fijación de nitrógeno; sin embargo, en los bosques, otros tipos de fijación parecen tener mayor significación.

Por último, la nodulación de leguminosas silvestres contribuye al reciclado del nitrógeno en la superficie de la tierra, aunque su contribución sea muy difícil de evaluar (Alexander, - 1977).

### 1.3.2.1. El género Rhizobium

El criterio para definir este género se refiere a su habilidad para formar nódulos en las leguminosas, estando incluido en la familia Rhizobiaceae, según el Manual Bergey (Buchanan y Gibbons, 1974). Otros géneros de esta familia, como Agrobacterium, están taxonómicamente muy próximos al género Rhizobium como muestran estudios de taxonomía numérica, análisis del DNA etc. (Lange, 1961; Graham, 1964): A menudo, existe mayor proximidad taxonómica entre los rizobios de crecimiento rápido y Agrobacterium que entre los de crecimiento lento y crecimiento rápido dentro del propio género Rhizobium (Graham, 1964), discutiéndose si todas las especies infectivas de las leguminosas deberían agruparse bajo un único género.

La clasificación en especies del género Rhizobium se hace en base a la especificidad de las cepas frente al huésped, estableciéndose los siguientes grupos de inoculación cruzada (Vincent, 1977):

#### 1 - Cepas de crecimiento rápido.

- a) R. leguminosarum-R. trifolii (Lathyrus, Vicia, Lens, Pisum, Trifolium)
- b) R. phaseoli (Phaseolus vulgaris, P. angustifolius, P. multiflorus)
- c) R. meliloti (Medicago, Melilotus, Trigonella)
- d) Algunos rizobios de Lotus, Cicer, Lupinus, Leucaena, Anthyllis.

2 - Cepas de crecimiento lento.

- a) Grupo "cowpea" (Vigna, algunos Phaseolus, Macroptilium, Lotus pedunculatus y otros)
- b) R. japonicum (Glycine max)
- c) R. lupini (Lupinus, Ornithopus)

Norris (1965) sugirió la división de los rizobios en dos grupos, los productores de ácido y los alcalinizantes, cuando se cultivan en extracto de levadura-manitol; por otra parte, los primeros, en general, coinciden con cepas de crecimiento rápido y los segundos con los rizobios de crecimiento lento.

Los rizobios libres son bacilos gram negativos, muy móviles con flagelación polar, subpolar o peritrica. Son productores en mayor o menor proporción, según las cepas, de mucílago hidrosoluble y presentan abundancia de gránulos de polibetahidroxibutírico. Dentro del nódulo se presentan en forma de bacteroide, con diferencias estructurales y funcionales respecto de la bacteria libre (Vincent, 1977) y que varían considerablemente de unas leguminosas a otras.

Los rizobios son organismos aerobios que utilizan como fuente de energía una gran variedad de hidratos de carbono, monosacáridos, disacáridos e incluso tri y polisacáridos. Las diferencias en la utilización de estos hidratos de carbono junto a otras propiedades establecen, a veces, diferencias entre especies y cepas. En vida libre necesitan nitrógeno combinado, aunque recientemente se han encontrado cepas capaces de fijar  $N_2$ , con

independencia de la leguminosa y bajo ciertas condiciones de cultivo, como son: fuente de carbono (xilosa, arabinosa o galactosa), un ácido dicarboxílico (ácido succínico) y una fuente de nitrógeno combinado (Stanier y col., 1976). Las últimas investigaciones sobre la categoría nutricional del género Rhizobium han mostrado la existencia de cepas autotrofas, dentro de las que poseen hidrogenasas (Hanus y col., 1979).

#### 1.3.2.2. Rhizobium en el suelo y rizosfera

Es claro que una adecuada densidad de rizobios en la rizosfera favorece la infección de las raíces de la leguminosa, aunque sólo unos pocos centenares de bacterias por gramo de suelo sean suficientes para ello.

Los rizobios están normalmente presentes en el suelo en número variable dependiendo de la cepa, de la naturaleza del suelo y del tratamiento agrícola a que se ve sometido. Utilizan para su crecimiento, a parte de otros nutrientes, los materiales segregados por las raíces de las plantas y, también, posiblemente por la microflora asociada a la rizosfera. Mientras un suelo bajo un cultivo, como trigo, contiene pocos rizobios (10 células/g) el mismo bajo leguminosas, podría contener hasta  $10^7$  células/g.

La habilidad de Rhizobium para mantenerse en el suelo se puede deducir del hecho de que cultivos de leguminosas nativas establecidas después de otros cultivos, llegan a presentar nodulación eficiente. Es evidente el efecto rizosfera de la --

leguminosa, estimulador del crecimiento de los rizobios, que se extiende a 10-20 mm de distancia de sus raíces: esta estimulación es específica, así Rhizobium es favorecido más que otras bacterias, y además cada leguminosa estimula rizobios específicos. Las sustancias responsables de la estimulación no han sido identificadas, pero se cree que el aumento de los rizobios en la rizosfera no es debido a liberación de los mismos por los nódulos ya que en ausencia de nodulación también se ha observado este incremento (Dixon, 1969).

Ha sido referido un efecto rizosfera positivo para el Rhizobium por parte de plantas no leguminosas. Rovira (1961) lo observó con Trifolium pratense y Paspalum dilatatum, ambos estimularon, pero la estimulación por Paspalum no fue selectiva para Rhizobium y sí la de Trifolium. Asimismo Poa australis estimuló Rhizobium trifolii y R. meliloti (Robinson, 1967), aunque el efecto fué siempre menor que el de la leguminosa. Hay otras y suficientes evidencias de que el Rhizobium sobrevive y crece en la rizosfera de no leguminosas (Dixon, 1969), lo cual es esencial para su mantenimiento en el suelo en ausencia del huésped: la desaparición después de diez años se atribuyó a los periodos de barbecho, más que a la ausencia de leguminosas (Dixon, 1969). Sin embargo, es un hecho establecido que las leguminosas excretan sustancias específicas estimuladoras de los rizobios. En este sentido apuntan resultados como los obtenidos por Rovira (1961), según los cuales Rhizobium spp. fue más estimulado por trébol, y a mayor distancia, que el resto de la población microbiana de su rizosfera.

### 1.3.2.3. El cultivo de las leguminosas

El cultivo de leguminosas es el único que puede abastecerse de gran parte del nitrógeno que necesita. Así, dependiendo, principalmente, del contenido de este elemento en el suelo, puede por término medio, conseguir un 80% a partir del N<sub>2</sub> atmosférico- (Burns y Hardy, 1976).

El cultivo de leguminosas bien en rotación de cultivos o como abono en verde, constituye una práctica tradicional introducida en oposición a los monocultivos y como consecuencia del constante incremento de precios de los fertilizantes nitrogenados (Döbereiner, 1978).

El balance de nitrógeno en un suelo bajo leguminosas, es influido por las prácticas del cultivo. Así, en el caso de que no sea recogida la cosecha y se incorpore al suelo, la totalidad del nitrógeno queda en él, pero aún si la cosecha se recoge el balance puede resultar positivo, con un pequeño incremento del contenido del mismo en el suelo (Tabla 1), muy importante, si consideramos lo que ocurre con otros cultivos, como cereales, en los que el suelo, queda desprovisto de nitrógeno y es preciso aportar grandes cantidades de fertilizantes para recomponer el balance de este elemento. Los resultados expuestos en la tabla 1, presentan las ganancias en nitrógeno, en experiencias de campo realizadas en condiciones óptimas, mostrando que éstas son prácticamente iguales en cultivos mixtos de leguminosas y cereales o gramíneas, que en cultivos simples de leguminosas. Además, la alfalfa y el

Tabla 1: Fijación y ganancia de nitrógeno en suelos de Ithaca,  
New York.

Cultivo	Nitrógeno cosechado en cultivo en 4 años (Kg/Ha)	Balance nitróge <sup>x</sup> no en suelo en 4 años (Kg/Ha)
Fleo pratense	157	45
Bromo	132	43
Fleo + N <sup>xx</sup>	480	- 47
Bromo + N <sup>xx</sup>	535	- 69
Fleo + Loto	778	823
Bromo + Alfalfa	1169	1169
Loto de cuernecillo	809	876
Alfalfa	1146	1168

<sup>x</sup> Pérdida o ganancia de nitrógeno, teniendo en cuenta el obtenido en el cultivo, los cambios en el suelo y el fertilizante añadido.  
<sup>xx</sup> Se aplicó un total de 695 Kg de nitrógeno. El resto recibieron 22 Kg de fertilizante nitrogenado.

loto parecen fijar la misma cantidad de nitrógeno en ambas si-  
tuaciones.

Los efectos beneficiosos del cultivo de leguminosas per-  
sisten durante varios años, como demuestra la mejora del rendi-  
miento de cereales o gramíneas cultivados en terrenos en los -  
que previamente hubo leguminosas (Alexander, 1977).

1.4. Problemática de la evaluación de los efectos de los plaguicidas sobre la microflora del suelo

La evaluación del impacto de los herbicidas sobre la microflora del suelo, se presenta complicada ante la multitud de interacciones entre el producto químico y este sustrato, así como ante la diversidad de su microflora y sus actividades.

Existe una lamentable carencia de métodos precisos para valorar la contribución real y actual de la microflora en las transformaciones del suelo, tanto como poca claridad ante la elección de parámetros interesantes, buenos indicadores del daño potencial de los plaguicidas sobre ella; siendo esencial para la correcta interpretación de los efectos producidos por factores externos en un ecosistema, el conocimiento del estado en que se presentan los organismos y el modo como actúan en el mismo.

Ante la gran cantidad de plaguicidas existentes y la diversidad de su composición química, sería deseable establecer -- ciertas generalizaciones sobre la interacción microorganismo-plaguicida, sin embargo las establecidas hasta ahora no son firmes, encontrándose muchas excepciones además de resultados de difícil comparación. En general, los efectos de los plaguicidas sobre los organismos del suelo, vienen determinados por cada plaguicida en particular, su persistencia y la concentración presente, con gran influencia de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo; siendo, primariamente, los plaguicidas selectivos en sus efectos sobre los distintos microorganismos y sus actividades.

Ya que un microorganismo coexiste en el suelo con otras especies, microbianas o no, sería inexacto presuponer que los resultados de estudios sobre especies aisladas, en cultivo puro, pudieran ser extrapolados al suelo. En términos generales, los factores fisicoquímicos incidentes sobre una población pueden ser enumerados, y aún deducidas sus influencias sobre dicha población; sin embargo resulta difícil precisar sus efectos combinados, aún cuando se trata de especies individuales, y todavía más el evaluar los efectos que el cambio de actividad de una especie o población pudiera tener sobre otras.

Otra razón para considerar lo inadecuado de los estudios en cultivo puro para deducir los efectos de los plaguicidas sobre la microflora del suelo, se debe en parte a la interacción de estos productos químicos y la materia orgánica e inorgánica del suelo, pudiendo resultar inaccesibles a los microorganismos o, por el contrario, presentar mayor toxicidad en el suelo. Así los coloides del suelo absorben o hidrolizan ciertas sustancias orgánicas conduciendo, frecuentemente, a una disminución de la toxicidad o a una menor duración del efecto. Además, la presencia de una determinada población puede, también, alterar la toxicidad de un plaguicida sobre otra población sensible.

Es también necesario destacar que los métodos empleados en el estudio de actividades biológicas interrelacionadas en el suelo, dejan bastante que desear en cuanto a su utilidad y reproducibilidad de los resultados, debido al complejo habitat en que trabajan los microbiólogos del suelo. En consecuencia, la tendencia

actual parece dirigida en el sentido de conceder mayor confianza a los resultados de estudios en cultivo puro frente a la experimentación en suelo, pero la única solución satisfactoria podría estar, mas bien, en el uso de ambas alternativas, aunque permanezca el interrogante de a cual conceder prioridad.

Los estudios con cultivos puros son de gran valor, tanto indicativo del efecto potencial del herbicida en el suelo, como para el esclarecimiento de los mecanismos de acción sobre microorganismos concretos. Sin embargo, estos no revelarían los posibles efectos secundarios o terciarios de la introducción de un plaguicida en el suelo, sobre un determinado tipo de microflora. Desde un punto de vista ecológico, los efectos en la microflora pueden considerarse debidos, por ejemplo, a la competencia por el  $O_2$ , nutrientes, etc. o a efectos de antibiosis, parasitismo o depredación: así, en este sentido, la reducción en el número o especies por la presencia de plaguicidas ha sido, a menudo, atribuída tanto a estimulación de protozoos, bdellovibrios, bacteriofagos o actinofagos, como al efecto directo del compuesto químico sobre la especie afectada. También ha sido considerada, a veces, la toxicidad de un plaguicida como resultado de su interacción con la materia orgánica e inorgánica del suelo: liberación de ácidos orgánicos tóxicos, o formación de clatratos y quelatos.

Otro problema importante es la elección entre el estudio con suelo "in situ" o con suelo "incubado" bajo condiciones controladas en el laboratorio. Concretamente, al estudiar los efectos de herbicidas en un sistema "in situ" se hace difícil la

comparación de los resultados obtenidos en suelos tratados con los de su control, no tratado, el cual conservaría toda su vegetación y así los organismos de su rizosfera. Por otra parte, las parcelas tratadas contendrían cierta mayor proporción de materia orgánica, restos de la flora destruida por el herbicida, y por tanto mayor cantidad disponible de posibles nutrientes para la microflora. La experimentación con suelo bajo condiciones controladas en laboratorio parece ser actualmente mejor aceptada, aunque deberían cuidarse, en especial, las condiciones de temperatura y humedad del suelo.

En resumen, aún existiendo, una extensa y desarrollada, aunque insuficiente, metodología para el estudio del complejo habitat microbiológico del suelo, son muy recientes los estudios de microbiología ecológica, esenciales para poder interpretar los efectos de factores externos en un ecosistema.

## 1.5. Efectos de los herbicidas sobre procesos del Ciclo del Nitrógeno

### 1.5.1. Nitrificación

#### 1.5.1.1. Aspectos generales de los efectos de los herbicidas en la nitrificación

Los organismos nitrificantes, extremadamente sensibles a los cambios en su habitat, lo son a veces, a la presencia de trazas de muchos productos de aplicación agrícola (Domsch, 1972).

Las mas completas revisiones, como la de Grossbard --

(1976) coinciden en señalar la inocuidad general de los herbicidas sobre la nitrificación a las dosis de aplicación de campo, aunque los hay que afectan significativamente este proceso a tales dosis, como son: PCP, DNOC, dinoseb, TCA, dalapón y trifluralina (Audus, 1970), diclorprop (van Schreven y col., 1970) y asulam (Ratnawera, 1973), aunque dependiendo en todos los casos del tipo de suelo. Sin embargo, los efectos inhibidores a menudo observados en la nitrificación, se producen a dosis muy superiores a las utilizadas en la práctica agrícola, incluso con herbicidas considerados tóxicos como los derivados de urea y carbamatos, siendo requeridas al menos 50 ppm de producto herbicida en suelo para reducir la formación de  $\text{NO}_3^-$  (Bartha y col., 1967; Debona y Audus, 1970; Grossbard y Marsh, 1974; Domsch y Paul, 1974).

La recuperación de la actividad nitrificante o de la población responsable del proceso es, en general, bastante rápida y completa después de la desaparición del herbicida. Además de presentarse adquisición de tolerancia, como parece ocurrir con derivados clorados alifáticos, carbamatos y sus homólogos (Otten y col., 1957; Teater y col., 1958) considerados persistentes mas allá de la duración de las experiencias.

La mayoría de los trabajos no distinguen efectos sobre las etapas de la nitrificación, pero con los datos de que se dispone se ha considerado a menudo que los herbicidas inhiben mas frecuentemente la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  que la de  $\text{NO}_2^-$  (Grossbard, 1976). Sin embargo, Domsch y Paul (1974) entre los 35 herbicidas ensayados, encuentran que la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  presentó mayor sensibilidad, lo que fue también observado con dinoseb, linurón (Sommer, 1970)

y simazina (Gaur y Misra, 1977). Caseley y Luckwill (1965) también obtuvieron mayor sensibilidad de Nitrobacter a varios herbicidas. En los últimos años son frecuentes las referencias de inhibición de nitratos (Dubey, 1969; Corke y Thompson, 1970; Ratnawera, 1973) cuando se utilizan técnicas de percolación, resultados que no están de acuerdo con los de Grossbard y March (1974) que trabajaron con suelos incubados. La observación de acumulación de  $\text{NO}_2^-$  en suelos estructuralmente alterados parece ocurrir con frecuencia a dosis relativamente bajas (Grossbard, 1976).

La nitrificación ha sido estudiada sobre todo "in situ" y considerando solo el nitrato final formado. A pesar de la acumulación de datos en este sentido, cada vez se hacen más difíciles las generalizaciones de los efectos de productos herbicidas u otros productos sobre este proceso ante la cantidad de resultados aparentemente contradictorios. Sin embargo, es un proceso que puede ser cuantificado con cierta precisión, por los métodos analíticos útiles de que se dispone.

El tipo de suelo, con sus características fisicoquímicas y biológicas puede ser determinante del efecto sobre la nitrificación, especialmente, porque es un proceso muy afectado por las alteraciones del ambiente con algunos factores de máxima importancia. Así se hace especial hincapié en la influencia del pH: Domsch y Paul (1974), en experiencias con 35 herbicidas y comparando con modelos matemáticos, obtuvieron mayor inhibición a pH menor de 7. Por el contrario, Smith y Weevaratna (1974) observaron retardo de la nitrificación en suelos alcalinos y estímulo en

suelos ácidos por simazina e ioxinil, sugiriendo la implicación de heterótrofos en la nitrificación.

La respuesta puede depender también del suplemento de iones  $\text{NH}_4^+$  o del sustrato nitrificable: así el enriquecimiento con  $\text{NH}_4^+$  antes del tratamiento con herbicida puede modificar sus efectos. Van Schreven y col. (1970) mostraron que dalapon, mecoprop y diclorprop, en suelos enriquecidos con  $\text{NH}_4^+$ , causaron acumulación de  $\text{NO}_2^-$  frente a sólo ligeras reducciones de la nitrificación obtenidas en suelo no suplementado. Vlassak (1975) apunta la dependencia de la respuesta con el sustrato oxidable, siendo la oxidación de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  aparentemente más sensible que la nitrificación a partir de urea. Sin embargo, Vlassak y Livens (1975) obtienen independencia del sustrato.

Se ha sugerido que los suelos tienen una inherente capacidad nitrificante y los que presentan alta capacidad son menos inhibidos que los de baja capacidad (Dubey y Rodriguez, 1970; Domsch y Paul 1974).

Los productos resultantes de la degradación de los herbicidas pueden diferencialmente afectar la nitrificación, como por ejemplo ocurre con los herbicidas fenilamídicos (Corke y Thompson 1970), siendo así conveniente prestar atención a la degradación de estos compuestos en el suelo, durante el periodo de ensayo.

Otra posibilidad es que el descenso de  $\text{NO}_3^-$ , resultante de un tratamiento herbicida, podría ser debido a efectos en el

proceso de desnitrificación, pero esto ha sido considerado por muy pocos investigadores. Por ello recurriremos al ejemplo de fungicidas: según Saive (1974) la aplicación de benomilo y fentin conducían a incrementos similares en los niveles de  $\text{NO}_3^-$  pero alterando procesos distintos. Así el primero parece estimular la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , mientras el segundo parece disminuir el grado de desnitrificación.

El estudio con suelo "in vitro" según técnicas de incubación y percolación ha sido tratado con cierta frecuencia. La distinción de los efectos producidos en el crecimiento de los nitrificantes o en su actividad fue abordada por Debona y Audus (1970), mediante técnicas de percolación, comparando las respuestas de suelos frescos frente a las de suelos con velocidad de nitrificación constante, donde el factor proliferación casi no cuenta. De esta manera, se ha observado que la actividad y el crecimiento de los quimioautotrofos nitrificantes pueden ser afectados independientemente (Quastel y Scholefield, 1951; Debona y Audus, 1970).

Son muy pocos los autores que abordan estudios sobre cultivos puros de quimioautotrofos nitrificantes. Caseley y Luckwill (1965) citan mayor sensibilidad de Nitrobacter agilis que Nitrosomonas europaea a varios herbicidas derivados de urea y atrazinas. Del último grupo, la simazina (6 ppm) inhibió N.agilis pero no N.europaea (Farmer y Renoit 1965), sin embargo Kulinska (1967) no encontró efecto a 100 ppm de este herbicida, concentración inhibitoria de la nitrificación según Torstensson (1974). Estas diferencias pudieran ser debidas a distintas cepas bajo ensayo, Winely y San

Clemente (1971) usando extractos libres de células de N.agilis demostraron el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa por carbamatos, CIPC y eptam, habiendo puesto de manifiesto la inhibición de la actividad de Nitrobacter sp. en un trabajo anterior (Winely y San Clemente, 1970). Los fenoles clorados presentan moderada toxicidad en los organismos nitrificantes, siendo requeridas concentraciones de 200-1000 ppm de DNOC para inhibir N.europaea en cultivo puro (Jensen y Petersen, 1952), en contraste con la dosis de 25 ppm inhibitoria de la nitrificación en suelo, efecto que duró mientras estuvo presente el herbicida (Douros, 1956).

#### 1.5.1.2. Efectos de herbicidas hormonales en la nitrificación

Los herbicidas hormonales no parecen afectar, o sólo transitoriamente, la nitrificación, aplicados al suelo a dosis próximas a las de uso agrícola, aunque esta conclusión está basada en una mayoría de trabajos realizados "in situ", habiéndose obtenido resultados muy diversos para el mismo herbicida, quizá debido a la variedad de suelos y condiciones experimentales. Por otra parte, a pesar de la ausencia de otro tipo de ensayos, con la mayor parte de los herbicidas de este grupo, los existentes apuntan a considerar escasa su actividad sobre los nitrificantes: 2,4-D y MCPA no tuvieron efecto en especies nitrificantes en cultivo puro (Chunderova y Zubets, 1970; Ratnayake y Audus, 1978) ni en suelos en percolación bajo condiciones controladas. MCPA y 2,4,5-T inhibieron la nitrificación sólo transitoriamente y a altas dosis (100 ppm). Asimismo, los derivados benzoicos, 2,3,6-TBA, dicamba y tricamba presentaron sólo ligera variación de algunos parámetros de la --

nitrificación tanto de suelo en percolación como de cultivos puros de especies tipo (Ratnayake y Audus, 1978).

Entre los fenoxiácidos el 2,4-D ha sido muy estudiado a dosis próximas a las de uso agrícola, mostrando diversos efectos. Así, la estimulación de la actividad nitrificante fue referida por Tyagny-Ryadno (1967), Fisyunov (1969), Boiko y col. (1969) y -- Deshmukh y Shrikhande (1975) en suelos diversos, entre los que se encuentran algunos de pH ácido (5,3), así como de la densidad de población nitrificante (Abueva, 1970) en un derno-podzol. Las referencias al retardo de la nitrificación por 2,4-D o su ester son también frecuentes (Kudzin y col., 1973; Abueva y Bagaev, 1975), a la vez que diversos autores no encuentran ningún efecto a tales bajas dosis (Teater y col., 1958; Liederman y col., 1971; Kudzin y col., 1973; Deshmukh y Shrikhande, 1974), incluso, después de repetidas aplicaciones (Chunderova y col., 1971). En otros trabajos se refiere, en el mismo suelo, ausencia de efecto o retardo de la nitrificación dependiente de la dosis de herbicida para 2,4-D y también con 2,4,5-T (Teater y col., 1958; Singh, 1971; Torstensson, 1974). Con otros herbicidas derivados del ácido fenoxiacético, como MCPA, se obtuvieron parecidos resultados. Según Hauke-Pacewiczowa y Krolowa, (1968) y Grossbard (1971) no afectó la nitrificación a las dosis de ensayo (5 ppm), pero aplicaciones menores condujeron a la reducción de la población nitrificante o a disminución de su actividad (De y Mukhopadhyay, 1971; Hauke-Pacewiczowa, 1971 y Hoffman-Kakol y Kwarta, 1972). Mezclas de MCPA y el fenoxibutírico MCPB también tuvieron efecto negativo, después de repetidas aplicaciones, aunque la nitrificación no fue afectada por estos productos por -

separado (Chunderova y col., 1971).

2,4-DES y 2,4-DEP fueron estimulantes a bajas dosis, -- aunque a partir de 10 y 30 ppm respectivamente redujeron la nitrificación (Zavarin, 1966).

Los fenoxipropiónicos, diclorprop y mecoprop, redujeron la actividad nitrificante en razón creciente a la dosis (van Schreven y col., 1970) y el fenoxibutírico, 2,4-DB, presentó inhibición a 1,5 ppm, pero dosis menores no tuvieron efecto aún después de repetidas aplicaciones (Chunderova y col., 1971).

De los derivados benzoicos, dicamba inhibió la nitrificación en un suelo derno-podzol franco (Bezuglov y col., 1973), produciendo el mismo efecto 2,3,6-TBA en un suelo pardo (Chandra, 1964).

Los organismos nitrificantes podrían adquirir tolerancia frente a los herbicidas hormonales, según fue sugerido por Slepecky y Beck (1950) y Pearce (1958) al obtener la desaparición de la inhibición inicial por 2,4-D, después de percolación continua. Lo mismo sugieren Debona y Audus (1970) en el caso de 2,3,6-TBA y picloram. Una segunda aplicación en suelo de 2,3,6-TBA o 2,4-DB - produjo menor inhibición que la inicialmente obtenida (Chandra, 1964).

## 1.5.2. Fijación de N<sub>2</sub> en la simbiosis Rhizobium-leguminosa

### 1.5.2.1. Aspectos generales de la acción de herbicidas en la simbiosis Rhizobium-leguminosa

Es evidente que se trata del estudio de una situación compleja que implica los posibles efectos en dos organismos muy diferentes y/o su interacción. En la simbiosis Rhizobium-leguminosa son aspectos fundamentales la capacidad de infección de los rizobios y la fijación efectiva de N<sub>2</sub>, pudiendo los herbicidas alterar estos procesos tanto a nivel de la bacteria como de la planta huésped o de su simbiosis.

Los efectos sobre Rhizobium spp. "in vitro" son de interés como indicadores del efecto potencial sobre la población de Rhizobium en vida libre en el suelo: la posible alteración, transitoria o no, de procesos bioquímicos en la bacteria podrían conducir a defectos en la infección de la planta huésped o en la fijación de N<sub>2</sub>. Por otra parte, cambios genéticos considerados, en especial, cuando se trata de exposición prolongada al herbicida, como es el caso de compuestos persistentes, podrían modificar aspectos como la resistencia de los rizobios a fagos, antibióticos etc., peligrando así su supervivencia en el suelo.

Los efectos sobre la planta huésped, tratándose concretamente de herbicidas, son probables y decisivos: Grossbard (1970) encontró que R. trifolii, pretratado con 50 ppm de asulam no afectó la nodulación ni la efectividad siempre que de sus células hubieran sido eliminados los residuos del herbicida. Asimismo, la

resistencia a TCA y dalapon fue mayor en R.leguminosarum que en su planta huésped, Pisum sativum (Sud y col., 1973). En general, la dosis de herbicida requerida para inhibir la nodulación, reducir el peso seco o el nitrógeno total en las leguminosas es muy pequeña (Fletcher y col., 1957; García y Jordan, 1969; Hauke & Pacewiczowa, 1970), mientras que concentraciones mayores del mismo herbicida son requeridas para inhibir el crecimiento de los rizobios, pudiéndose afirmar que, en muchos casos, el efecto último en el crecimiento de la planta es debido más a la acción tóxica sobre el huésped que sobre la bacteria. Así ocurre con el 2,4-D, 2,4,5-T MCPA, paraquat (Fletcher y col., 1956 y 1957; Nilsson, 1957; - - - Mickovski, 1966 ) y linurón, incluso tratándose de un herbicida - - como el último que afecta sensiblemente al Rhizobium (Grossbard, - 1975). También trifluralina y carbetamida redujeron la nodulación y nitrógeno fijado en trébol y loto, posiblemente por efecto sobre la planta (Brock, 1972).

Por otra parte, los efectos, ocasionalmente estimulantes o nulos, causados por triazinas en la nodulación de haba y altramuza (Kaiser y col., 1970) junto a una nula toxicidad obtenida para los rizobios en cultivo puro (Kaszubiak, 1966) sugieren que el efecto primario de estos herbicidas es sobre la planta.

Sin embargo se presentan casos de mayor tolerancia por parte de la planta huésped que por parte de la bacteria; Vlassak (1975) refiere la específica inhibición de la fijación de  $N_2$  por dinoseb en la nitrogenasa del Rizobium y Makawi y col., (1971) observaron que simazina reduce el número de nódulos formados en - -

Phaseolus vulgaris proporcionalmente a la dosis, a la vez que crece la toxicidad en la bacteria nodular.

1.5.2.2. Aspectos generales de la acción de herbicidas en Rhizobium spp.

En la bibliografía se encuentran recopilaciones más o menos amplias de los trabajos sobre los efectos de herbicidas en Rhizobium (Audus, 1964, Grossbard, 1976; Anderson, 1978).

Rhizobium spp. es un género de resistencia relativamente grande a los herbicidas, y así en vida libre (in vitro o en el suelo) es, en general, poco o nada afectado a dosis de uso agrícola. Kecskes(1972) encuentra que de 104 herbicidas sólo seis inhiben el 50% de las cepas ensayadas, pertenecientes a seis especies de Rhizobium.

Se presenta una clara selectividad en las respuestas de las rizobios frente a ciertos herbicidas a nivel no sólo de especie sino también de cepa. Kapusta y Rouwenhorst (1973) encontraron diferencias de sensibilidad al clorprofam en las seis cepas de R.japonicum ensayadas.

La tolerancia se ha referido, a veces, dependiente de las condiciones y medio de cultivo, resultando influenciada por el pH (Kaszubiak, 1966; Balicka, 1969) u otros factores: por ejemplo, asulam fue más tóxico para Rhizobium en medios deficientes en  $Ca^{2+}$  (Grossbard, 1970). La posible interacción entre el polisacárido

do formado por el Rhizobium y el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, pudiera influir - en la sensibilidad a este herbicida (Grossbard, 1975). El efecto de 2,4-D en la respiración de R.meliloti fue dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  (Johnson y Colmer, 1957). En algunos casos la toxicidad varía con las condiciones fisiológicas de las células: el 2,4-DB cuando se añadió a células en fase logarítmica de crecimiento no se vió afectado el Rhizobium pero sí se afectó si se añadía a células en fase de latencia (Jordan y García, 1969).

A menudo, se ha encontrado mayor tolerancia por parte de los rizobios de crecimiento rápido, R.trifolii, R.leguminosarum y R.meliloti, frente a los de crecimiento lento, R.lupini y R.japonicum, en ensayos con fenoxiherbicidas, derivados de urea y dinitrofenoles (Jensen y Petersen, 1952; Kaszubiak 1966, 1968a). También pyrazona y DNOC, herbicidas de los mas tóxicos para las anteriores especies de crecimiento rápido (Jensen, 1969), presentaron en éstas según Grossbard (1970) inhibición desde 1000 ppm, mientras R.lupini y R.japonicum fueron inhibidos de 100 a 500 ppm (Kaszubiak, 1968a). Ante las diferencias encontradas por diversos autores en el grado de sensibilidad de cepas de la misma especie de Rhizobium, se podría generalizar que la susceptibilidad de los rizobios frente a los herbicidas depende más de la cepa que de la especie Vintikova y col., 1965; Makawi y Abdel-Ghaffar, 1970). En apoyo de esta afirmación pueden invocarse los resultados obtenidos por Kaszubiak (1966) en los cuales cepas con velocidades de crecimiento mayores presentaron mayor tolerancia frente a los herbicidas ensayados, pero aún entre estas cepas de crecimiento rápido, R.meliloti, R.leguminosarum, R.phaseoli y R.trifolii, se observó una amplia escala -

de dosis inhibitoras desde 5 a 300 ppm para un mismo herbicida -  
(Mickovski, 1966).

En la bibliografía se cita la inversión de efectos para -  
una misma cepa dependiente de la dosis de herbicida: por ejemplo,  
dinoseb resultó ser estimulante de la respiración de Rhizobium has-  
ta dosis de 50 ppm pero ya a 70 ppm la inhibió completamente, mien-  
tras el conteo de viables fué significativamente reducido desde -  
2 ppm (Grossbard, 1975).

En términos generales se presenta toxicidad variable y -  
dependiente de la estructura química del compuesto herbicida, aun-  
que a menudo, también específica para ciertos compuestos muy simi-  
lares. Así, las triazinas y derivados halogenados alifáticos no -  
fueron tóxicos y sí los carbamatos, derivados de urea y dinitrofe-  
noles, estando en este último grupo algunos de los herbicidas más  
tóxicos de los encontrados para Rhizobium (García y Jordan, 1969;  
Kaszubiak, 1966, 1968a, 1968b; Jensen, 1969; Grossbard, 1975).

Se encuentran algunos trabajos sobre efectos mutagénicos  
o de selección de mutantes, causados por herbicidas de muy diferen-  
te estructura química. Pero en general la tolerancia de Rhizobium  
a los herbicidas parece ser más frecuentemente debida a la adapta-  
ción fisiológica de la bacteria (Jensen y Petersen, 1952; Kasubiak  
1966). Sin embargo, en ocasiones se presenta incapacidad de los ri-  
zobios para adaptarse a dosis subletales de herbicida, como se ob-  
servó con algunos derivados de urea y dinitrofenoles (Kaszubiak,  
1968a; 1968b), que por otra parte ejercen acción mutagénica, como  
se observó entre la población superviviente a dosis bactericidas

de afalon; y presentan toxicidad selectiva sobre ciertos mutan\_ -  
tes de Rhizobium. Gillberg (1971) seleccionó mutantes de Rhizobium  
resistentes a altas dosis de dinoseb y MCPA que conservaron e, in\_  
cluso, aumentaron la fijación de N<sub>2</sub> en simbiosis con la legumino\_  
sa. Dosis de 500 y 1000 ppm de dinoseb y paraquat fueron mutagénic\_  
cas para Rhizobium y 100 ppm, dosis también mutagénica, fue tolerada  
igualmente por los rizobios procedentes de suelos tratados y no -  
tratados (Namdeo y Dube, 1973). Otros efectos mutagénicos o de se\_  
lección de mutantes se han investigado después de la exposición de  
los rizobios al herbicida durante largos periodos de tiempo, estu\_  
diándose, entre otros, las consecuencias en su infectividad y efec\_  
tividad en la fijación de N<sub>2</sub>: en estas condiciones la atrazina no  
afectó el crecimiento de trébol siempre que hubiese sido eliminada  
del inóculo, sin embargo cambios genéticos adversos parecen produ\_  
cirse con linuron (Grossbard, 1970, 1975).

#### 1.5.2.3. Efectos de herbicidas hormonales en Rhizobium spp. y su simbiosis con leguminosas

El particular interés surgido, en cuanto a los efectos -  
de los herbicidas hormonales sobre Rhizobium spp., se debe al he\_  
cho de que IAA (ácido 3-indolacético) es excretado al medio de -  
cultivo en considerable cantidad por cepas efectivas, así como por  
la posible implicación de dicha auxina en la infección de la raíz  
de la leguminosa (Libbenga y Bogers, 1974).

En estudios "in vitro" la adición de IAA produjo laten\_  
cia en la iniciación del crecimiento de Rhizobium, sin efecto en

la división exponencial de las células, y dependiente de la relación IAA/número de bacterias (Dullaart y col., 1971). Sin embargo, el ácido giberélico no afectó directamente el crecimiento en las cepas estudiadas, tres de R.trifolii y una de R.meliloti (Fletcher y col., 1959).

Los herbicidas hormonales tipo auxina no afectan los rizobios a dosis de campo, siendo en general, tóxicos sólo a concentraciones muy superiores a las toleradas por la planta huésped (Fletcher y col., 1958). Se presenta muy a menudo, una amplia escala de dosis tóxicas para la misma especie de Rhizobium y determinado compuesto herbicida, según un significativo número de trabajos realizados por distintos autores. Pero la valoración y comparación de estos resultados experimentales se hace difícil debido a que los métodos de determinación de toxicidades están basados en la medida de halos de inhibición o implican la adición de sustancias solventes, no inocuas, así como por la variabilidad de tiempos y condiciones de incubación. A pesar de todo se tiende a considerar que la sensibilidad es dependiente más de la cepa que de la especie de Rhizobium (Audus, 1964; Makawi y Abdel Ghaffar, 1970; Grossbard, 1970). Así para los fenoxiherbicidas 2,4-D, MCPA, MCPB, 2,4-DB y 2,4,5-T las dosis inhibitorias oscilan entre 50-4000 ppm, 100-3000 ppm y 400-8000 ppm para R.trifolii, R.lupini y R.leguminosarum respectivamente. La mejor ilustración de la diversidad de toxicidades inter e intraespecíficas se refleja en los datos referentes al 2,4-D, herbicida muy estudiado: este compuesto retrasó el crecimiento de R.leguminosarum a 50 ppm, mientras dosis cinco

veces mayores fueron requeridas para R.meliloti y R.japonicum (Gaur y Misra, 1972). También Krasil'nikov (1967) cita tolerancias de algunos rizobios a 300 ppm. Según Mickovski (1966) 2,4-D y también MCPA y MCPB presentaron un amplio rango de dosis tóxicas, de 5-300 ppm en las especies de crecimiento rápido, R.meliloti, R.le\_guminosarum, R.phaseoli y R.trifolii.

La supresión temporal del crecimiento de rizobios de Lo\_tus corniculatus por 2,4-DB se dió desde 50 ppm y la inhibición completa desde 500 ppm (Jordan y García, 1969), resultando inocuo en 17 cepas de R.meliloti a dosis de 3 mg/disco (Camugli y G.Etchart 1974). El 2,4,5-T produjo inhibición proporcional a la dosis desde 200 ppm, siendo total a 1000 ppm (Jordan y García, 1969).

A pesar de la incertidumbre que da el disponer de pocos datos, parece que el efecto de los ácidos fenoxiacéticos o sus ésteres no difiere esencialmente del de los fenoxibutíricos (Alexander, 1958), aunque los primeros se mostraron ligeramente más tóxicos para Rhizobium (Fletcher, 1956, 1957). Además, se ha referido que los fenoxibutíricos presentan mayor toxicidad en cepas de crecimiento rápido (Kaszubiak, 1966). Se ha citado, también, que la introducción de halógenos aumenta la toxicidad de los fenoxiherbidas (Fletcher y col., 1956).

Los rizobios parecen presentar capacidad de adaptación a concentraciones inhibitorias de algunos fenoxiherbidas (2,4-D, MCPA, MCPB, 2,4-DB), pero no de otros (2,4,5-T) (Fletcher y Raymond, 1956). La tolerancia de este género a los herbidas

hormonales es en general, una adaptación fisiológica, como se ha demostrado para el 2,4-DB (Jordan y García, 1969), pero también puede ser consecuencia de la selección de mutantes. Así Gillberg (1971) aisló mutantes resistentes a MCPA los cuales, en simbiosis con la leguminosa, mostraron, incluso, estimulada su capacidad fijadora de  $N_2$ .

Los herbicidas hormonales causan daños en las leguminosas, en general, a dosis relativamente muy inferiores a las toleradas por Rhizobium. Incluso aplicaciones a dosis de uso agrícola pueden afectar la nodulación y crecimiento de la planta, por un efecto tóxico sobre la misma, induciendo entre otros efectos, alteraciones en la raíz. Así ocurre con 2,4-D, 2,4,5-T, MCPA y MCPB en trébol (Fletcher y col., 1957), con MCPA en alfalfa (Nilsson, 1957) y 2,4-DB en lotos (García y Jordan, 1969) y trébol (Peters y Ben Zbiba, 1979). Sin embargo, se ha comprobado reducción de nodulación sin efectos sobre la raíz por 2,4-D en Phaseolus vulgaris (Anderson y Baker, 1950) y por MCPB en trébol blanco (Fletcher y col. 1956). Muy bajas concentraciones de 2,4-D y MCPA, sin efecto en el crecimiento de la planta, ni en la nodulación, redujeron el nitrógeno fijado. Hauke - Pacewiczowa (1969), obtuvieron reducción de la nodulación por MCPB y no por 2,4-D y MCPA, en el mismo suelo. Por el contrario, 2,4-D y MCPA aplicados a alfalfa redujeron tanto su nodulación como eficiencia (Mickovski, 1966); incluso a dosis tan bajas como 0,1 ppm fueron afectados alfalfa, guisante y trébol blanco (Torstensson, 1975). 2,4-DB no tuvo efecto en la nodulación y rendimiento de alfalfa (Fletcher y col., 1957), pero sí afectó -

severamente la nodulación de Lotus corniculatus (García y Jordan, 1969). Cloramben en cultivos de soja produjo efectos ligeramente tóxicos en algunos casos, pero en otros presentó estimulación de la nodulación (Avrov y col., 1968). La toxicidad en soja también fué citada por Dunigan y col., (1970).

Hay pocos trabajos referentes a la supervivencia de los rizobios en el suelo en presencia de herbicidas. En este sentido, Jensen (1969) no vió ningún efecto por parte del 2,4-D y MCPA.

#### 1.6. Efectos de herbicidas piridínicos tipo auxina en el Ciclo del Nitrógeno

##### 1.6.1. Antecedentes bibliográficos de la acción de herbicidas derivados de piridina en la nitrificación

El picloram es el único herbicida de este tipo estudiado en cuanto a su efecto sobre la nitrificación. Prácticamente todos los trabajos se han realizado en suelos "in situ" o en suelos incubados en laboratorio, determinando únicamente los niveles de  $\text{NO}_3^-$  alcanzados después de un cierto tiempo de contacto con el herbicida; presentándose una gran diversidad de resultados que no permiten, por ahora, establecer conclusiones sobre su acción en el proceso de nitrificación.

Así a dosis bajas de aplicación (2 ppm) de picloram Dubey (1969) encuentra ya inhibición significativa de la nitrificación en las 8 semanas del ensayo en dos de los tres suelos incubados en laboratorio, inhibición que fué total a 100 ppm. Sin

embargo, Grover (1972) a dosis de hasta 1 ppm y Thorneburg y Tweedy (1973) de hasta 12 ppm no observaron reducción del  $\text{NO}_3^-$  formado y Goring y col. (1967) refieren sólo el 50% de inhibición de la nitrificación a la alta dosis de 1000 ppm y ninguna a 100 ppm.

Otros autores, en experiencias realizadas "in situ" en diferentes suelos y a bajas dosis de aplicación, refieren ausencia de efecto (van Schreven y col., 1970) o disminución de la nitrificación (Bezuglov y col., 1973), así como incremento de la población nitrificante (Gogvadze y col., 1972).

Solamente el trabajo de Debona y Audus (1970) estudia, entre otros muchos herbicidas, el efecto del picloram sobre la nitrificación de suelo por técnicas de percolación. El autor lo sitúa entre los de baja potencia inhibidora. Por otra parte, es el único trabajo que aporta alguna luz sobre la posible forma de respuesta de la población nitrificante a la presencia del herbicida.

#### 1.6.2. Antecedentes bibliográficos de la acción de herbicidas derivados de piridina en Rhizobium spp. y su simbiosis con leguminosas

Prácticamente no se encuentran en la literatura revisada estudios sobre los efectos de compuestos derivados de piridina sobre la simbiosis Rhizobium-leguminosa, a excepción de los citados a continuación, referentes a la acción sobre Rhizobium spp.

Camugli y Gómez Etchart (1974) estudiaron la sensibilidad

de 17 cepas de R.meliloti al picloram, observando inhibición general en la especie sólo a las dosis más altas de ensayo. Además tres de las cepas fueron estimuladas a concentración variable. En comparación, el 2,4-DB, herbicida hormonal incluido también en este trabajo, no afectó a ninguna de las cepas a las mismas dosis. Los ensayos realizados por estos autores consistieron en la observación de halos de inhibición alrededor de discos impregnados con el herbicida.

La tolerancia de una cepa de R.phaseoli a 1000 ppm de picloram fue referida por Goring y col. (1967).

#### 1.7. Objetivo de la presente tesis

Se ha abordado el estudio de los efectos de dos herbicidas estructuralmente relacionados (derivados de piridina), picloram y 3,6-D, sobre dos procesos microbiológicos del suelo: la Nitrificación y la Fijación Biológica de Nitrógeno en la simbiosis Rhizobium-leguminosa. Ambos procesos tienen importancia fundamental desde el punto de vista de la fertilidad del suelo y en el reciclado global del nitrógeno en la naturaleza.

Teniendo en cuenta que la nitrificación es llevada a cabo, principalmente, por microorganismos autotrofos, considerados dentro de la variada flora microbiana del suelo como de los más sensibles a las alteraciones de su habitat, incluida cualquier distorsión del equilibrio biológico, se ha considerado el estudio de los efectos de compuestos químicos aplicados al suelo sobre el

proceso de nitrificación, como indicador del posible efecto deletéreo de los mismos en el conjunto de la comunidad microbiológica que sustenta dicho suelo.

Los dos compuestos objeto de estudio son herbicidas de gran potencia y modo de acción semejante en el vegetal, siendo su diferencia fundamental la susceptibilidad al ataque microbiano.

El estudio de los efectos en la nitrificación se ha realizado tanto en suelo "in vitro", bajo condiciones controladas de laboratorio, como en cultivo puro de las especies autotrofas más comunes responsables del proceso. Los dos tipos de estudios son válidos y complementarios ante el doble hecho de la gran sensibilidad de los autotrofos nitrificantes a las alteraciones en su microhábitat y la similitud fisiológica de dichos autotrofos junto a una amplia distribución de sus especies tipo en los distintos suelos.

El estudio de los efectos de los herbicidas en la simbiosis Rhizobium-leguminosa se ha centrado en ensayos en cultivo puro y orientados bajo un doble aspecto:

- Acción ejercida en cepas de Rhizobium de varios grupos fisiológicos, como indicativo del efecto potencial de la presencia de herbicida en la bacteria en vida libre; así como contribución al esclarecimiento del modo de acción de estos compuestos sobre este grupo microbiano y la respuesta del mismo.

- Efecto producido por los herbicidas en Rhizobium en -  
relación con su capacidad de infección y efectividad fijadora de  
nitrógeno en simbiosis con la leguminosa, evaluando esta última me  
diante la determinación de la actividad nitrogenasa de los nódul\_  
los.

Nota: El nombre químico de los compuestos plaguicidas que aparecen  
en este apartado y siguientes se da en el apéndice 3.

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Ensayos sobre nitrificación

#### 2.1.1. Cepas

Las cepas objeto de estudio en cultivo puro fueron Nitrosomonas europaea, ATCC 19718 y Nitrobacter agilis, ATCC 14123.

Las cepas se conservaron a 4°C en cultivo líquido. N. europaea en el medio de Skinner y Walker (1961) (apéndice 1.4.) y N. agilis en el recomendado por la ATCC (apéndice 1.5.).

#### 2.1.2. Suelo

Las muestras se tomaron de un suelo inculco de vega de la finca de experimentación "El Encin" del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, situada en el término municipal de Alcalá de Henares (Madrid).

Las principales características de este suelo, según el análisis facilitado por el Departamento de Ecología del INIA, son las siguientes:

Textura: Franco-arenosa

Arena gruesa	25,7%
Arena fina	35,5%
Limo	26,3%
Arcilla	12,5%
pH (1/2,5 en agua, p/v)	7,75

Materia orgánica	3,4%
Nitrógeno total	0,28%
Bases de cambio: Ca <sup>++</sup>	16,2 meq/100 g
Mg <sup>++</sup>	0,6 meq/100 g
K <sup>+</sup>	0,6 meq/100 g
Na <sup>+</sup>	0,1 meq/100 g
Capacidad iónica de cambio total	17,5 meq/100 g
Capacidad de campo	21%

### Preparación del suelo

Las muestras de suelo fueron tomadas a una profundidad entre 0 y 25 cm. Se dejaron secar al aire, siendo luego pasadas por tamices de 13 y 2 mm para utilizar la fracción intermedia obtenida.

### 2.1.3. Herbicidas

Los herbicidas estudiados fueron: picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico) y 3,6-D (ácido 3,6-dicloropicolínico) suministrados por la Dow Chemical Company de Madrid.

Cuando se trató de estudios en cultivo puro ambos compuestos se aplicaron en la mayoría de los ensayos, salvo indicación contraria, bajo la forma de producto técnico, con grados de pureza del 99% y 99,3% en producto ácido, para picloram y 3,6-D respectivamente. En los ensayos con suelo fueron utilizadas las formulaciones comerciales: Tordon 22K (sal potásica de picloram;

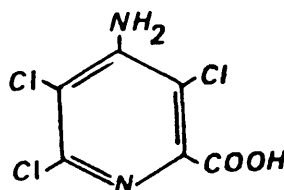
con un 25% de riqueza en producto activo) y Lontrel 300 (sal de monoetanolamina de 3,6-D, con un 33% en producto activo).

Las dosis ensayadas están referidas a producto ácido puro, siendo distintas para cada herbicida e incluidas en cada caso dentro de los respectivos límites de solubilidad en agua.

### Propiedades fisicoquímicas

#### Picloram

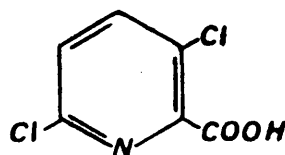
Fórmula estructural



Estado físico	Polvo blanco
Peso molecular	241,5
Punto de fusión	190°C
Presión de vapor	$6,16 \times 10^{-7}$ mm Hg a 35°C
Solubilidad	430 ppm a 35°C en agua, 1,98% en acetona, 0,55% en isopropanol y 0,06% (p/v) en cloruro de metileno

3,6-D

Fórmula estructural



Estado físico	Sólido cristalino blanco
Peso molecular	192
Punto de fusión	151-152°C
Presión de vapor	$1,2 \times 10^{-5}$ mm Hg a 25°C
Solubilidad	1000 ppm a 20°C en agua, 25% (p/p) en acetona, xileno y metanol

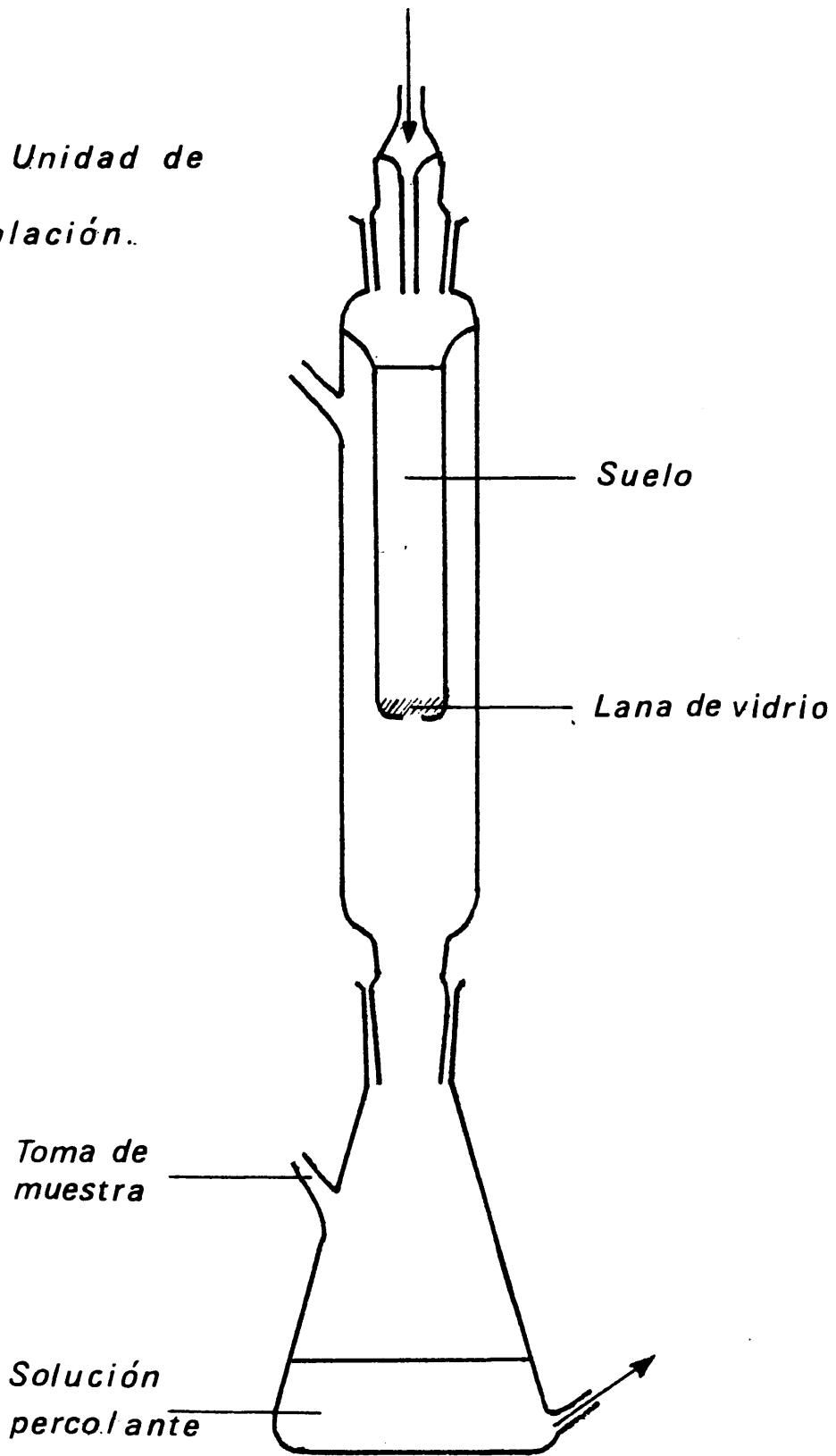
2.1.4. Técnicas de percolación de suelo y métodos analíticos

Técnicas de percolación

Se aplicaron las técnicas de percolación de Lees y Quastel (1946), utilizándose para ello el aparato de percolación de la figura 1, acoplado a una bomba peristáltica LKB, modelo 2115 MULTIPERPEX, que permite el funcionamiento de cuatro percoladores simultáneamente.

Las columnas de cada unidad de percolación se montaron con 32 g de suelo preparado según se detalló anteriormente en el apartado 2.1.2. y al que luego se añadieron las cantidades requeridas de herbicida diluidas en 10 ml de agua estéril. Una vez seco de -

*Fig.1. Unidad de percolación.*



nuevo, el suelo se homogeneizó y utilizó para llenar las columnas de percolación. Para facilitar el drenaje fue necesario incluir aproximadamente un 20% de arena estéril distribuida en capas intercaladas en la columna de suelo, las unidades de percolación se esterilizaron previamente junto con el medio de percolación.

La percolación se llevó a cabo continuamente con 250 ml de medio de Winogradsky (Girard y Rougieux, 1967) (apend. 1.2) conteniendo  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  a una concentración inicial de  $\text{N-NH}_4^+$  de alrededor de 100 mg/ml y a un flujo de 16 ml/h, el máximo que no producía encharcamiento de la columna de suelo. Las percolaciones transcurrieron a temperatura ambiente, 20 y 25°C, y en la obscuridad.

Se pudo seguir simultáneamente la marcha de la nitrificación en cuatro percoladores, de los cuales uno fue siempre un control sin herbicida y los tres restantes se probaron para las distintas dosis de tratamiento. Se realizaron al menos dos experiencias por dosis.

El proceso de nitrificación fue seguido por análisis diarios de las concentraciones de nitritos y nitratos separadamente, de alícuotas de un ml de líquido de percolado y se determinó, a su vez, a intervalos de tiempo más espaciados la suma de nitritos y nitratos, en análisis conjunto, bajo la forma de  $\text{N-NO}_3^-$ . El pH del líquido percolante se vigiló, por sus posibles diferencias en cada percolador según el tratamiento herbicida aplicado.

### Análisis de nitritos

El análisis cuantitativo de nitritos en la solución de percolación se hizo usando el método de Griess-Llosvay descrito por Lees y Quastel (1946).

Alícuotas de 0,5 ml de líquido percolante o su dilución si es necesario, se llevaron hasta 11 ml con agua destilada a los que luego se añadieron 2 ml de la mezcla, a partes iguales y reacción preparada, de reactivo de diazotación y reactivo acomplejante (apéndice 2.1). Después de agitar la muestra se dejó reposar unos 20 minutos, midiéndose luego, a 520 nm en un espectrofotómetro, la intensidad de color desarrollada.

La concentración de nitrito de las muestras se determinó por referencia a la curva de calibración obtenida con los resultados a partir de distintas diluciones de una solución patrón de  $\text{NO}_2\text{Na}$ , en el rango de concentraciones de  $\text{N-NO}_2^-$  entre 0 y 0,120 mg/ml.

### Análisis de nitratos

Se siguió el método colorimétrico del ácido fenoldisulfónico (Bremner, 1965).

Una de las variantes que permite este método, y que ha sido empleada en este ensayo, consiste en el siguiente proceso: un ml de líquido percolante se lleva a tubo de ensayo al que se añade  $\text{CO}_3\text{Ca}$  en polvo fino, evaporando luego, la muestra a sequedad

preferiblemente en baño de agua hirviendo. En el caso de determinación de la suma de nitratos mas nitritos, bajo la forma de nitratos, se añadieron 0,2 ml de peróxido de hidrógeno al 6%. Al residuo seco se le añaden 2 ml de reactivo de ácido fenoldisulfónico (apéndice 2.2), diluyendo, al cabo de 20 minutos de contacto, con agua destilada hasta disolución total del residuo. Se transvasa a matraz aforado donde es llevado a reacción débilmente alcalina -- (indicado por la aparición de coloración amarilla), por adición de solución de  $\text{NH}_4(\text{OH})$  en agua al 50%. Después de añadir 2 ml de exceso de esta solución, se completa el volumen hasta 100 ml con agua destilada, midiéndose la intensidad de color desarrollada a 420 nm en un espectrofotómetro.

La curva de calibración se obtuvo en un intervalo de concentraciones de  $\text{N-NO}_3^-$  entre 0 y  $100 \mu\text{g/ml}$ , a partir de una solución patrón de  $\text{NO}_3\text{K}$ .

El líquido de percolación no presentó color ni turbidez -- que interfiera con los análisis colorimétricos, así no fue necesario el pretratamiento con agentes clarificantes o decolorantes de las alícuotas de la solución percoladora.

#### 2.1.5. Técnicas de solución de suelo y métodos analíticos

Se prepararon tubos conteniendo 4 ml de los medios de Winogradsky, bien para nitrificantes autotrofos oxidantes de amonio (con  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  como sustrato) o bien para oxidantes de nitrito (con  $\text{NO}_2\text{Na}$ ) (Girad y Rougieux, 1967) (apéndice 1.2 y 1.3), incorporando -

en ambos las diferentes dosis a ensayar de los herbicidas, además de los respectivos controles de los mismos medios sin herbicida.

A partir de 1 ml de las diluciones decimales sucesivas - de suelo, desde  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , se inocularon réplicas de cinco tubos por dilución, para cada grupo de los anteriores nitrificantes y cada tratamiento herbicida. La dilución  $10^{-1}$  se considera la obtenida suspendiendo 10 g de suelo en 95 ml de solución Ringer al 25% estéril, tomándose las muestras después de 10 minutos de agitación de la suspensión en presencia de bolitas de vidrio, que favorecen la disgregación de las partículas y microorganismos (Alexander y Clark, 1965).

La incubación se llevó a cabo a  $28^{\circ}\text{C}$  hasta un máximo de 35 días, investigándose a intervalos de una semana la presencia de nitritos y nitratos.

Cuando el sustrato oxidable es  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  la presencia ya de nitritos o nitratos supone actividad de Nitrosomonas o géneros afines; en el caso de ser  $\text{NO}_2\text{Na}$  la presencia de Nitrobacter o semejantes se detecta por desaparición del nitrito y detección de los nitratos formados.

### Métodos analíticos

Para el análisis cualitativo de nitritos se utilizó el reactivo de Griess-Llosvay, ( apéndice 2.1 ). Los nitratos se detectaron valiéndonos de la misma reacción, llevándose a cabo así

su previa reducción a nitritos, por la adición de una pequeña cantidad de polvo mezcla de Zn-Cu-MnO<sub>2</sub> (apéndice 2.3). En ambos casos son positivas las muestras en las que hay desarrollo de color que, según la concentración de nitritos, podrá variar tanto en el color como en su intensidad desde el rosa hasta el naranja oscuro.

Para el cálculo del número más probable (NMP) de microorganismos viables de la muestra original utilizamos las tablas de probabilidad de Cochran (Alexander, 1965a).

#### 2.1.6. Técnicas de incubación de suelo y métodos de recuento de nitrificantes

##### Técnicas de incubación de suelo

Se estudió la evolución de la población nitrificante en el mismo suelo utilizado en las anteriores experiencias, sometido a igual pretratamiento (apartado 2.1.2) e incubado bajo condiciones ajustadas de laboratorio: así, se suplementó con SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> como sustrato oxidable y con distintas dosis de los herbicidas a estudiar, expresadas, tanto estas como la concentración de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en base al agua libre del suelo. Un control se mantuvo sin herbicida.

El procedimiento fué el siguiente: a muestras de 1000 g de suelo, se les añadió el volumen de medio de enriquecimiento de Winogradsky (apéndice 1.2), con la correspondiente cantidad de herbicida, necesario para llevar la humedad al 80% de su capacidad de campo. Así, tanto la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como la de herbicida en

la fase líquida del suelo es la que se considera a efectos comparativos con otros ensayos. Se mezcló esto cuidadosamente y dividió cada muestra en dos réplicas de 500 g cada una, que se introdujeron en bolsas de polietileno cerradas con plástico adhesivo impidiendo este sistema la pérdida de humedad pero permitiendo a su vez el intercambio de gases necesario para la actividad microbiana.

Estas bolsas se mantuvieron a temperatura ambiente entre 20 y 25°C, tomándose muestras a los 0, 7, 15, y 30 días de incubación para realizar recuento de viables autotrofos nitrificantes.

#### Recuento de viables

El recuento de viables autotrofos nitrificantes se realizó por separado para los nitrosantes y nitratantes, llevándose a cabo en medio líquido, según el método del NMP.

De cada una de las bolsas réplica por tratamiento fué tomada una muestra de 10 g de suelo para la preparación de sucesivas diluciones decimales en solución Ringer al 25%, (según procedimiento del apartado 2.1.5.) a partir de las cuales se inocularon series de tres tubos por dilución con 4 ml de medio de enriquecimiento, bien de Nitrosomonas o bien de Nitrobacter, de Winogradsky, -- (apéndices 1.2 y 1.3 respectivamente).

Al cabo de 35 días de incubación a 26°C se analizó la presencia de nitratos y nitritos, como indicadora de actividad de

gérmenes nitrosos, o sólo de nitratos, indicadora de los nítricos.

La determinación del NMP de organismos viables en el suelo a los distintos tiempos de incubación se hizo con ayuda de las tablas de probabilidad de Cochran.

### Métodos químicos de análisis

Para la detección cualitativa de nitratos y nitritos en los tubos de recuento se procedió como en el apartado 2.1.5.

#### 2.1.7. Técnicas de cultivo puro de bacterias nitrificantes y méto dos analíticos

Los efectos de los herbicidas se probaron en los siguientes medios líquidos, según la cepa: Nitrosomonas europaea: en me-dio de Winogradsky para nitrificantes nitrosos (apéndice 1.1) y en el medio de Skinner y Walker (apéndice 1.4). Nitrobacter agilis se -cultivó en medio Winogradsky para nitrificantes nítricos (apéndice 1.2) y en el recomendado por la ATCC para esta cepa (apéndice 1.5).

El cultivo de ambas cepas en condiciones de agitación se realizó en matraces de 200 cc con 30 ml de medio nutritivo con y sin las distintas dosis de los herbicidas a ensayar, mientras que para los cultivos en condiciones estáticas se utilizaron tubos de ensayo de 30 mm de diámetro con 25 ml de los mismos medios de cul-tivo.

En todos los casos la inoculación se hizo con 0,5 ml

de un cultivo líquido que contenía de 20 a 50  $\mu\text{g/ml}$  de los productos finales nitrito o nitrato, según se tratase de Nitrosomonas sp. o Nitrobacter sp.

El pH de los cultivos de Nitrosomonas en el medio de Skinner y Walker se mantuvo, a lo largo del crecimiento, entre 7,5 - 8,0, por adicción de solución estéril de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 5%, cuando el rojo fenol (indicador incluido en el medio) viraba de rosa a amarillo como consecuencia de la caída del pH por debajo de 7,5.

La incubación se llevó a cabo a  $26^\circ\text{C}$ , tomándose muestras diariamente para la cuantificación, en cada caso, de los nitritos o nitratos producidos, según los métodos analíticos del apartado 2.1.4.

## 2.2. Ensayos sobre Rhizobium

### 2.2.1. Cepas

Las cepas de Rhizobium utilizadas en este trabajo y reseñadas en la tabla 2, fueron aisladas de un suelo ácido (pH 4,5-5,0) de fondo de valle, franco limoso, perteneciente a la localidad de Cañamero (Cáceres).

En algunos ensayos se utilizaron los siguientes mutantes de la cepa nativa Ca-7:

Ca-7 Kan<sup>+</sup>, resistente a 200  $\mu\text{g/ml}$  de kanamicina.

Ca-7 Str<sup>+</sup>, resistente a 250  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycinina.

Ca-7 Kan<sup>+</sup> Str<sup>+</sup>, resistente a los dos antibióticos a las concen-

traciones anteriores.

Las cepas se conservaron en Extracto levadura-manitol-agar (EMA) (Vincent, 1970) (apéndice 1.6.) y los mutantes en el mismo medio mas el correspondiente antibiótico.

Tabla 2. Cepas nativas de Rhizobium utilizadas en las experiencias con herbicidas.

Cepa	Efectividad en
Tr-3	<u>Trifolium repens</u>
Ts-7	<u>Trifolium subterraneum</u>
B-12	<u>Ornithopus compressus</u>
B-7	<u>Lotus pedunculatus</u>
Ca-7	<u>Cicer arietinum</u>

#### Aislamiento de las cepas

Se utilizaron suspensiones de suelo en agua estéril - para la inoculación, en condiciones asépticas, de plántulas de las siguientes leguminosas: Trifolium spp., Medicago spp., Lotus spp., Vicia spp., Phaseolus sp., Hedysarium sp., Pisum sativum, Cicer arietinum, Glycine max, Ornithopus compressus.

Se inocularon volúmenes de 1 y 5 ml de suspensión de - suelo (1/5 p/v) por planta. Las plantas habían sido dispuestas - para su cultivo en tubos de ensayo o tiestos dependiendo del tamaño de la leguminosa. Otros detalles sobre el cultivo aséptico de las plantas se dan en el apartado 2.2.4.2.

A partir de los nódulos obtenidos se procedió al aislamiento de los rizobios según el siguiente procedimiento: los nódulos se lavaron fuertemente con agua conteniendo trazas de tween 80. Luego se esterilizaron superficialmente por inmersión momentánea en alcohol de 96° seguida de otra, durante 3 minutos en una solución de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  en agua al 0,1%, acidificada con  $\text{ClH}$  (0,5 ml de  $\text{ClH}$ ,  $d=1,16$ , por litro). La eliminación posterior del  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  se hizo por repetidos lavados en agua destilada estéril (Vincent, 1970).

El aislamiento de los rizobios nodulares se realizó inoculando, un asa de siembra del machacado de un nódulo, en EMA (apéndice 1.6.). Una vez llevada a cabo la purificación de las cepas aisladas se procedió a la inoculación en la leguminosa correspondiente para comprobar su nodulación y capacidad fijadora de nitrógeno.

#### Ensayos de caracterización fisiológica de los rizobios

La velocidad de crecimiento se calculó a partir del tiempo de generación determinado siguiendo la absorbancia a 550nm durante la fase exponencial de crecimiento, en medio Extracto de levadura-manitol (EM) (Vincent, 1970) (apéndice 1.6.).

La capacidad para modificar el pH del medio de cultivo EM se investigó después de 4 ó 7 días de crecimiento de los rizobios, según la cepa.

Los cambios producidos en leche tornasolada se observaron después de dieciocho días de incubación a 26°C en tubos de -

ensayo conteniendo 10 ml de leche tornasolada (Harrigan y McCance, 1968) (apéndice 1.11.), inoculados con 0,1 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio EM.

La producción de mucílago se pudo observar tanto en cultivo líquido en medio EM, como en sólido EMA.

El ensayo de especificidad cepa-huésped se realizó inoculando cada cepa de las aisladas en las restantes leguminosas - reseñadas en la tabla 2, según detalles del cultivo de plantas - del apartado 2.2.4.2.

### 2.2.2. Herbicidas

Los dos herbicidas objeto de estudio, picloram y 3,6-D se utilizaron, en todos los casos, bajo la forma de producto técnico, con grados de pureza del 99% y 99,3% respectivamente.

Ambos compuestos se incluyeron en los medios de cultivo en solución acuosa, ya que prácticamente todos los ensayos - fueron realizados a concentraciones comprendidas dentro de los - respectivos límites de solubilidad en agua. Cuando fue preciso utilizar otros disolventes por necesidad de solubilizar mayores - dosis se indicará expresamente.

La esterilización de los medios de cultivo con los herbicidas incluidos se realizó en autoclave a 115°C durante veinte

minutos. El picloram es un compuesto muy estable tanto en medio básico como ácido, hidrolizándose a 6-hidroxiderivado, sólo en alcalí concentrado caliente (Ransey, 1967). Además hemos comprobado, mediante cromatografía de gases la estabilidad del picloram y 3,6-D al tratamiento térmico a que se sometieron las disoluciones acuosas.

### 2.2.3. Técnicas para el estudio de Rhizobium "in vitro"

#### 2.2.3.1. Crecimiento en medio sólido

El herbicida fue incluido en el medio de cultivo Rh<sub>6</sub>-agar (apéndice 1.7) sin modificar el pH resultante como consecuencia de la adición del compuesto o alternativamente ajustándolo a pH 6,8.

Se sembró, en la superficie del medio en placa, un asa de una suspensión de rizobios en agua estéril obtenida a partir de un cultivo joven. La incubación se llevó a cabo a 26°C durante un tiempo variable para cada cepa.

Cuando se trató de ensayos de crecimiento a dosis superiores a las de solubilidad en agua, los herbicidas se aplicaron disueltos en etanol sobre discos de papel Whatman, de 100  $\mu$ l, de volumen de absorción. Los discos después de la eliminación del solvente fueron aplicados sobre placas de Rh<sub>6</sub>, que habían sido inoculadas con 0,3 ml de un cultivo líquido en el mismo medio a una densidad óptica, a 550 nm, de aproximadamente 0,25.

#### 2.2.3.2. Curvas de crecimiento

Los efectos de los herbicidas en el crecimiento se -- evaluaron en cultivo líquido mediante medidas de la absorbancia a lo largo del tiempo a 550 nm en un espectrofotómetro.

Con 1 ml de cultivo en fase logarítmica de crecimiento en medio Rh<sub>6</sub> se inocularon 50 ml del mismo medio, solo o suplemen- tado con distintas cantidades de herbicida. Las lecturas de absor- bancia se efectuaron a intervalos de tiempo de incubación depen- dientes de la velocidad de crecimiento de cada cepa. La incubación se llevó a cabo a 26°C y en condiciones de agitación.

#### 2.2.3.3. Efecto bactericida

Células cultivadas en medio líquido Rh<sub>6</sub> fueron recog\_i- das por centrifugación, y volúmenes iguales (alrededor de 2 ml) de su resuspensión en agua estéril fueron añadidos al mismo medio - Rh<sub>6</sub> pero conteniendo las distintas dosis del herbicida; asimismo se llevó un control sin herbicida. A intervalos de tiempo durante la incubación, a 26°C y en agitación, se tomaron muestras para la realización del recuento de viables en placa en Rh<sub>6</sub> libre de her- bicida.

#### 2.2.3.4. Medidas de respiración

Se hicieron por el método manométrico directo en un - Warburg B Braun Melsungen (Dixon, 1952). La respiración de las - suspensiones de células se siguió determinando el consumo de O<sub>2</sub>,

eliminándose el CO<sub>2</sub> producido durante la respiración por absorción sobre hidróxido potásico.

El oxígeno consumido se determinó aplicando la ecuación:

$$\mu\text{l O}_2 \text{ consumido} = h K_{\text{O}_2}$$

en la que h es la diferencia (en mm) entre las alturas de fluido en la rama abierta del manómetro y la conectada al matraz, corregidas para cualquier variación durante la experiencia mediante la adición o sustracción de los cambios en la altura de fluido en el termobarómetro. K<sub>O<sub>2</sub></sub> es la constante, para el oxígeno, de cada matraz con su manómetro, calculada según la ecuación:

$$K_{\text{O}_2} = \frac{V_g \cdot \frac{273}{T} + V_f \alpha_{\text{O}_2}}{P_0}$$

donde V<sub>g</sub> es el volumen de la fase gaseosa, V<sub>f</sub> es el volumen de la fase líquida, T = 273-t siendo t la temperatura a la que se lleva a cabo la experiencia, α<sub>O<sub>2</sub></sub> el coeficiente de solubilidad del O<sub>2</sub> a la temperatura de la experiencia y P<sub>0</sub> la presión normal (760 mm Hg) en mm de fluido manométrico.

#### Efecto de la adición de herbicida a células no adaptadas

Células cultivadas en agitación, en medio líquido Rh<sub>6</sub> y en fase logarítmica de crecimiento, se recogieron por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos y se resuspendieron en tampón fosfato 50 mM, pH 7, al que se adicionó Cl<sub>2</sub>Mg 2,5 mM. Aliquotas de esta suspensión se llevaron hasta 2,5 ml con el mismo --

tampón más manitol (200 mM) y se dispusieron en la base de los ma\_ -  
traces de Warburg. El herbicida se puso en la rama de dicho ma\_ -  
traz. Cuando la cantidad de herbicida sobrepasó el límite de so\_ -  
lubilidad en agua, se procedió a la inversa, la suspensión de cé\_ -  
lulas fué colocada en la rama del matraz Warburg y el resto de -  
los componentes en la base. La densidad de células de la suspen\_ -  
sión fue ajustada, de forma que la densidad óptica de su dilución  
al 1/20 fuese aproximadamente de 0,2.

El consumo de  $O_2$  se siguió a intervalos de tiempo des\_ -  
de el momento de contacto de las células con el herbicida, siendo  
la temperatura de incubación  $26^{\circ}C$  y corrigiéndose los valores se\_ -  
gún las variaciones de un termobarómetro que contenía agua.

Se estudió el efecto de dos concentraciones, una sin -  
efecto sobre el crecimiento y otra que lo afectaba de alguna mane\_ -  
ra.

#### Efecto de la adición de herbicida a células adaptadas

Las células se cultivaron en presencia de herbicida y -  
se trataron como en el apartado anterior, siguiéndose el efecto  
de la adición de herbicida en el consumo de  $O_2$ , frente a un con\_ -  
trol sin él. Se ensayaron las mismas concentraciones que en el -  
apartado anterior.

### 2.2.3.5. Análisis de RNA

El ácido ribonucleico se extrajo según el método de Ogur y Rosen (1950), por el siguiente procedimiento: Las células lavadas se centrifugaron y suspendieron en 5 ml de ácido perclórico frío, 0.2 N, centrifugando de nuevo a 4°C. Se repitió este proceso, suspendiéndose luego el residuo en 5 ml de ácido perclórico 1N durante 18 horas a 4°C. Pasado este tiempo la suspensión se centrifugó de nuevo en frío y el residuo se extrajo dos veces más con 5 ml de ácido perclórico frío 1N. Luego se juntaron los tres últimos extractos, los cuales contenían el RNA.

El RNA se analizó por el método colorimétrico de Herbert y col., (1971), según el siguiente procedimiento: a tubos de 15 ml se llevaron 1 ml de muestra y 3 ml de reactivo de orcinol (apéndice 2.4). Los tubos se calentaron en baño de agua hirviendo durante 20 minutos, se enfriaron y se añadió n-butanol hasta completar los 15 ml. Se leyó en espectrofotómetro a 672 nm. Como patrón se utilizó una solución de ribosa, calculándose el valor del RNA a partir de la ribosa.

### 2.2.3.6. Análisis de proteína

El análisis de la proteína total bacteriana se hizo de acuerdo con el método del microbiuret según Goa (1953).

Las células lavadas se centrifugaron y se resuspendieron luego en agua. A muestras de hasta 1,5 ml se les añadieron

4 ml de NaOH 0,75 M, calentando a 75°C durante dos horas. Después de enfriar se añaden 0,2 ml de reactivo de Benedict (apéndice 2.5), centrifugado previamente si fuese necesario. Transcurridos 15 minutos se lee en espectrofotómetro a 340 ó 600 nm. Como patrón se utilizó albúmina de suero de bovino.

#### 2.2.3.7. Capacidad de utilización de los herbicidas como fuente de carbono y energía

Los rizobios se cultivaron en un medio definido (Vincent, 1970) (apéndice 1.9) y en el mismo medio en el que se incluyó el herbicida a una concentración de 100-200 ppm.

Inoculos tomados en la fase logarítmica de cada uno de los cultivos anteriores, se sembraron en el medio definido libre de fuente de carbono, pero suplementado con 100 ppm de herbicida, siguiéndose el crecimiento por absorbancia a 550 nm en espectrofotómetro.

#### 2.2.3.8. Resistencia a antibióticos

Los rizobios se cultivaron en medio líquido Rh<sub>6</sub> solo o suplementado con 400 ppm de picloram ó 1000 ppm de 3,6-D. Volúmenes de 0,3 ml de los anteriores cultivos a igual densidad óptica, aproximadamente 0,25, se extendieron homogéneamente sobre placas de Rh<sub>6</sub>-agar.

Los antibióticos se aplicaron sobre discos de papel -

Whatman a tres dosis distintas, según el antibiótico y cepa, colocándose, después de la evaporación del disolvente, sobre la superficie del medio inoculado.

Después de un tiempo de incubación variable para cada cepa se observó la zona de inhibición alrededor de los discos.

#### 2.2.4. Técnicas para el estudio de la simbiosis Rhizobium-leguminosa

Los efectos de los herbicidas en Rhizobium en relación a la simbiosis con la leguminosa se llevaron a cabo con las cepas Ca-7, Ts-7 y B-7 y las respectivas leguminosas huéspedes -- Cicer arietinum var. blanco-venoso (garbanzo), Trifolium subterraneum var. clare (trébol) y Lotus pedunculatus (loto).

##### 2.2.4.1. Obtención del inóculo de Rhizobium

Los rizobios se cultivaron en agitación en medio líquido Rh<sub>6</sub>, sin y con las diferentes dosis de herbicida, hasta densidad óptica de aproximadamente 0,25, a 550 nm. Las células fueron recogidas por centrifugación y luego lavadas tres veces por sucesivas resuspensiones, en tampón Dixon (apéndice 1.13), y centrifugaciones a 12.000 g durante 10 minutos a 15°C. La suspensión final en tampón fué utilizada como inóculo de las plántulas de leguminosas. El número de células del inóculo fué ajustado por adición del mismo tampón, para que la densidad óptica de una suspensión diluída 1/10, fuese de aproximadamente 0,2.

#### 2.2.4.2. Cultivo de plantas

Se utilizaron semillas esterilizadas según el procedimiento siguiente (Vincent, 1970):

Inmersión en etanol 95% seguido de tratamiento durante 3 minutos con  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 0,2% con trazas de Tween 80. Para la esterilización de las semillas de garbanzo, de contaminación más persistente, fueron necesarios de 5 a 6 minutos. La eliminación de los restos de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  se hizo por repetidos lavados en agua destilada estéril.

Las semillas se pusieron a germinar en placas de agar al agua al 1,5% estéril a  $24^\circ\text{C}$  y en la oscuridad hasta que la raíz alcanzó unos pocos milímetros.

Las plantas de loto se cultivaron en condiciones asépticas, en tubos de ensayo de 26 mm de diámetro con solución nutritiva libre de nitrógeno, Jensen (Vincent, 1970) (apéndice 1.10) - utilizándose como soporte de las plantas, papel secante doblado en el extremo superior, donde era colocada la semilla germinada.

Las plantas de trébol y garbanzo se crecieron en tiestos, llenos de arena más vermiculita al 50%, y dispuestos en unidades Leonard (Vincent, 1970). La solución nutritiva fue la misma solución Jensen. Después de la siembra e inoculación de los rizobios correspondientes, la superficie del tiesto fue cubierta con arena parafinada estéril.

Tanto los tubos como los tiestos se regaron periódica\_ mente con la anterior solución nutritiva diluída 1/5.

Se llevaron controles sin inocular tanto sin nitrato - como con él. En este último caso, fue añadido  $\text{NO}_3\text{K}$  al 0,05%, va\_ rias veces a lo largo del crecimiento.

El crecimiento se efectuó bajo las condiciones de cáma\_ ra climatizada provista de una iluminación de 25.000 lux, durante 16 horas al día. La temperatura durante el periodo día/noche fue de  $24^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ , excepto para las plantas de garbanzo que fue de --  $28^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.4.3. Inoculación

Con los rizobios tratados como se detalla en el apar\_ tado anterior (2.2.4.1), se sembraron cuatro tiestos por trata\_ miento, cada dos con inóculo de un mismo cultivo. En cada tiesto se cultivaron cuatro plántulas de garbanzo o seis de trébol. En el caso del loto se inocularon seis tubos por tratamiento, que - contenían una sola planta.

La densidad de la suspensión de rizobios a inocular estuvo alrededor de  $10^8$  células/ml, poniendo sobre cada plántula volúmenes de 5, 2,5 y 1 ml respectivamente, para garbanzo, tré\_ bol y loto.

#### 2.2.4.4. Determinación de la actividad nitrogenasa en nódulos

Los nódulos se obtuvieron de plantas de 30 días, en el caso del garbanzo, mientras que el periodo de crecimiento fué de 6 semanas para el trébol y loto. Para la medida de actividad nitrogenasa de los nódulos se tomaron las muestras, al azar, entre las plantas cultivadas en un mismo tiesto, determinándose la reducción de acetileno por los nódulos según el procedimiento siguiente (Schwinghmer y col., 1970):

Se tomaron segmentos de raíz o la parte radicular entera (si la planta se cultivó en tubo), que contenían 0,1-0,25 g de nódulos frescos en el caso de garbanzo y 0,01-0,03 g para las restantes plantas, trébol o loto. Este material fué recogido después de un mínimo de tres horas de exposición a la luz e inmediatamente se realizó el ensayo de la reducción de acetileno.

Las raíces con nódulos se introdujeron en viales de 20 ó 30 cc de capacidad, que se cerraron herméticamente, inyectándose 2 ó 3 cc de  $C_2H_2$  (10% concentración final en aire). Con un testigo, raíz sin nódulos, se procedió de la misma manera. A partir de los viales, se tomaron muestras del gas para la determinación del etileno producido. El tiempo de exposición al acetileno fué elegido dentro del periodo de actividad lineal de la nitrogenasa, previamente determinada para los distintos nódulos.

La determinación de etileno se hizo en un cromatógrafo de gases Konic, modelo Cromatix KNC 2000, equipado con detector de

ionización de llama y columna de 0,3 x 186 cm rellena de poropak  
R(80 - 100 de malla).

### 3. R E S U L T A D O S

#### 3.1. Efectos de los herbicidas picloram y 3,6-D sobre la nitrificación

##### 3.1.1. Efectos sobre la densidad de población nitrificante activa en cultivos suspensión de suelo

Las toxicidades de distintas dosis de picloram y 3,6-D sobre la población nitrificante (presuntamente autotrofa) en cultivos suspensión de suelo, según el apartado 2.1.5 de Material y Métodos, se exponen en la tabla 3. En ella se da la media de dos valores de MNP de microorganismos viables, o que presenta actividad en presencia de herbicida, dentro de los 35 días de incubación.

Hasta las dosis de 50 ppm de picloram ó 100 ppm de 3,6-D, no se vieron afectadas significativamente ni la población nitrosante, ni la nitratante, si se compara con los respectivos controles sin herbicida. Así, la inhibición apareció a distintas concentraciones, según el herbicida: a 200 ppm de picloram ó 500 ppm de 3,6-D, se redujo la población activa de oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  a, aproximadamente, el 10% y dosis de ensayo superiores a éstas la redujeron ya al 1% para ambos herbicidas. La población nitratante presentó mayor sensibilidad que la nitrosante, permaneciendo sólo alrededor de un 0,1% de la población en actividad, en presencia de 200 ppm de picloram o de 1000 ppm de 3,6-D.

Tabla 3. Densidad de la flora nitrificante activa en presencia de picloram<sup>xx</sup> y 3,6-D<sup>xx</sup> en cultivo de diluciones de suelo.

Dosis (ppm)	Población $\times$ Nitrosante	Población $\times$ Nitratante
<u>Picloram</u>		
0	$1,8 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$
50	$2,0 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^5$
100	$6,4 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^4$
200	$1,4 \cdot 10^2$	$3,3 \cdot 10^2$
400	$2,1 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^1$
<u>3,6-D</u>		
0	$9,5 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^5$
100	$7,9 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$
500	$1,2 \cdot 10^3$	$7,3 \cdot 10^2$
1000	$2,3 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^2$

$\times$  Microorganismos viables por gramo de suelo seco.

<sup>xx</sup> aplicados como formulación (Tordon 22K y Lontrel 300 respectivamente) con la concentración indicada en - producto puro

### 3.1.2. Efectos sobre la nitrificación de suelo en percolación

Los efectos de los herbicidas sobre el proceso de nitrificación en el suelo bajo estudio y en las condiciones de percolación que se detallan en el apartado 2.1.4, de Material y Métodos, se estimaron a partir de los valores de la concentración de nitra-

tos alcanzada en la solución de percolación en el transcurso del tiempo.

Simultáneamente se siguió la evolución de los nitritos - para la distinción de efectos en las dos etapas de la nitrificación, la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  y de  $\text{NO}_2^-$ .

Los valores experimentales de  $\text{N-NO}_3^-$  en función del tiempo fueron sometidos a ajuste según la ecuación exponencial 1:

$$1) \log \frac{y}{A - y} = k (t - t_1)$$

donde:  $y = \mu\text{g N-NO}_3^- / \text{ml percolado}$  .

A = valor asintótico de y. Teóricamente próximo a la concentración inicial de  $\text{N - NH}_4^+$  de la solución de percolación

$t_1 =$  tiempo correspondiente a  $y = \frac{A}{2}$  , en días

t = tiempo transcurrido desde el comienzo de la experiencia en días

k = constante

A partir de los parámetros de las ecuaciones según 1, se obtuvieron las correspondientes curvas estimadas de velocidad de nitrificación en función del tiempo, cuya ecuación es:

$$2) \frac{dy}{dt} = \frac{k (A - y) y}{A} - L10$$

De estas curvas de velocidad deduciremos dos parámetros interesantes en la evaluación de efectos en el proceso de nitrifi-

cación (Debona y Audus, 1970):

-  $V_{\max}$ : velocidad máxima de producción de nitratos alcanzada para cada tratamiento. Este parámetro es indicativo de la densidad de la población saturante y, naturalmente puede, además, variar en la medida en que la velocidad de nitrificación por célula es afectada por el tratamiento.

-  $1/T_{1/2}$ : velocidad de proliferación de los microorganismos nitrificantes, siendo  $T_{1/2}$ , el tiempo para el que la velocidad de nitrificación resultó ser semimáxima. Este parámetro se considera como una medida del retraso del crecimiento de la población nitrificante.

### 3.1.2.1. Efectos de picloram

Los resultados de la aplicación de distintas dosis de picloram (aplicado como la formulación Tordon 22K) en la cinética de nitrificación de suelo bajo condiciones de percolación, se muestran en las figuras 2, 3 y 5 y en las tablas 4 y 7. En ellas exponemos los resultados de una experiencia representativa de todas las repeticiones efectuadas (al menos dos) para cada dosis de herbicida.

La exposición de resultados como valores medios de los correspondientes a la misma dosis no es posible debido a las significativas variaciones encontradas en la nitrificación de los controles (sin herbicida) entre sí y dependientes de la muestra de -

suelo utilizado. Así los resultados expuestos son los correspondientes a la experiencia que en conjunto presentó los mejores ajustes al modelo matemático según la anterior ecuación 1; siendo los correspondientes valores experimentales los expuestos en la tabla 4.

La observación conjunta de las figuras 2 y 3 muestra que para todas las dosis de picloram ensayadas se presentó cierto retardo de la nitrificación aunque no proporcional a la dosis de este herbicida; así fue creciente hasta presentar el mayor retraso a 50 ppm para disminuir luego hasta las 400 ppm, la mayor dosis de las ensayadas.

Los parámetros de las curvas de las figuras 2 y 3 así como el análisis estadístico de los ajustes se dan en la tabla 5.

En ningún caso se presentaron diferencias apreciables en los valores finales de nitratos obtenidos para las distintas dosis de tratamiento, siendo a su vez semejantes al valor del control y resultado de la nitrificación total del  $\text{NH}_4^+$  con que había sido suplementado el suelo.

La fig.4 representa las curvas estimadas de velocidad de nitrificación en función del tiempo según la ecuación 2, siendo expuestos en la tabla 6 los parámetros deducidos a partir de las mismas.

Las velocidades máximas de producción de nitratos alcan

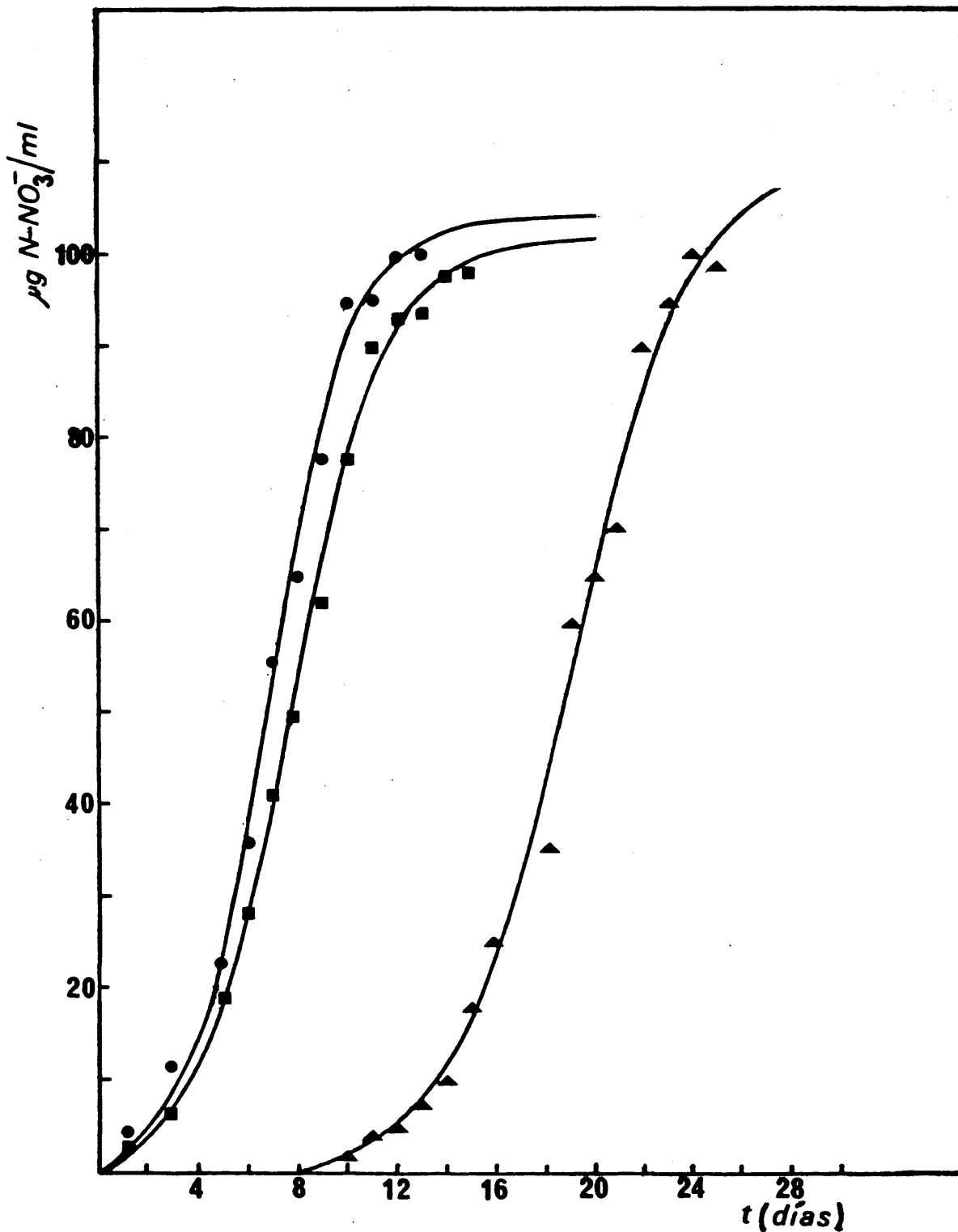


Fig. 2. Efecto de distintas dosis de picloram (formulación Tordon 22K) en la cinética de la nitrificación de un sistema de percolación de suelo. ● 0, ■ 25 y ▲ 50 µg/ml de solución. El análisis estadístico de los datos representados se recoge en la tabla 5.

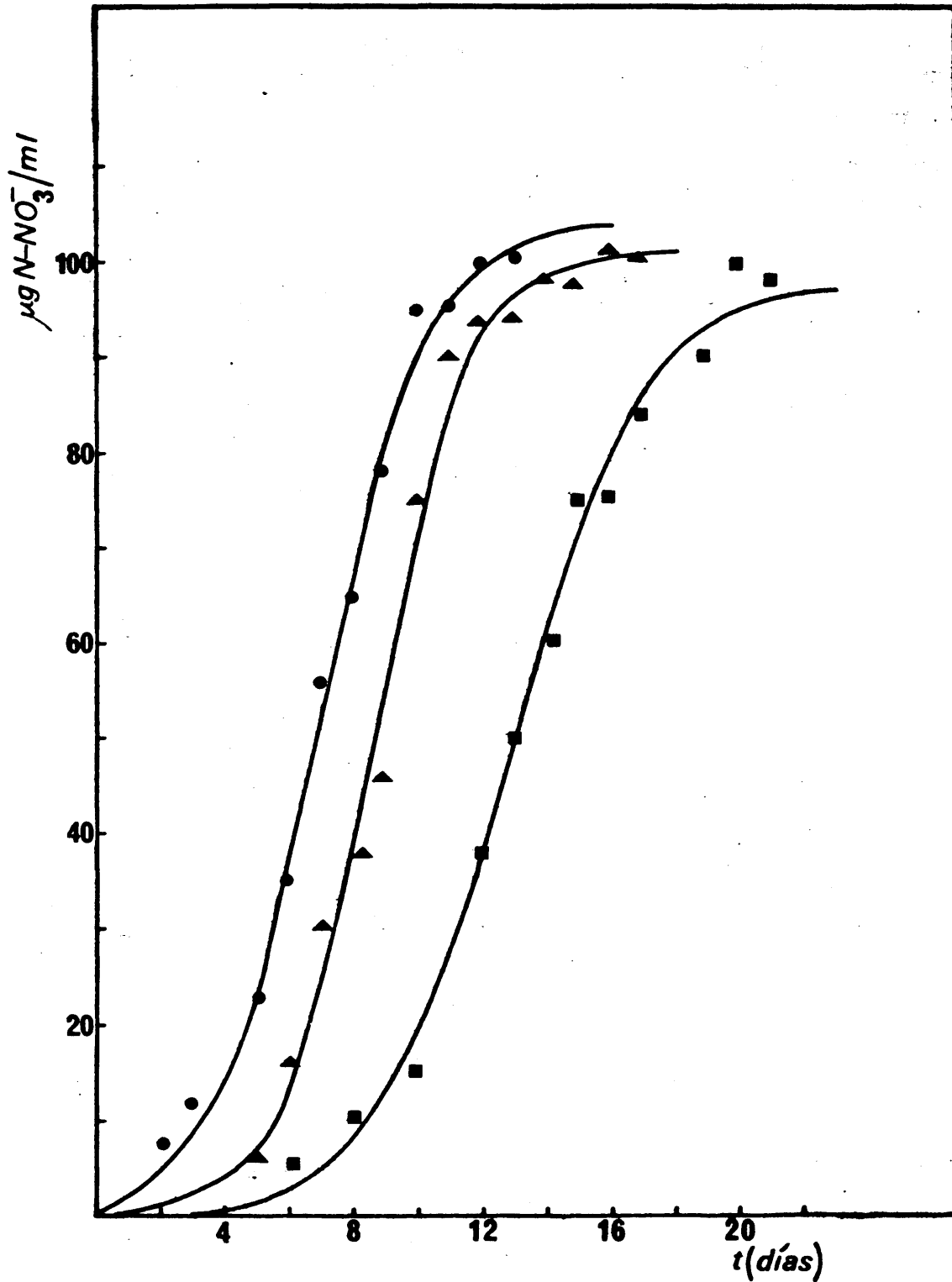


Fig. 3. Efecto de distintas dosis de picloram (formulación Tordon 22K) en la cinética de la nitrificación de un sistema de percolación de suelo. ● 0, ■ 200 y ▲ 400  $\mu\text{g/ml}$  de solución. El análisis estadístico de los datos representados se recoge en la tabla 5.

Tabla 4. Cinética de la nitrificación de un sistema de suelo en percolación en presencia de distintas dosis de picloram.\*

Tiempo (días)	Dosis (ppm)**				
	0	25	50	200	400
1	4,0 (5,0)	3,0 (3,5)	1,5 (2,0)	1,5 (2,0)	1,2 (1,0)
2	8,2		1,0 (1,5)	1,5	1,0
3	12,5 (15)	7,2 (9)	0,3 (0,9)	0,7 (1,0)	3,0 (3,0)
4			0,4 (0,6)	1,0	
5	23,0	19,0 (20)		3,2	6,0 (7)
6	35,0 (37)	28,0	0,0 (0)	7,5 (8)	16,0
7	56,0	41,5 (42)			30,5 (31)
8	65,5 (63)	50,5	0,0 (0)	11,0 (13)	37,0
9	78,2	62,0 (61)			45,5 (46)
10	94,0 (94)	78,0	2,0 (4)	15,0 (18)	74,2
11	95,0	90,2 (90)	4,0 (7)	27,5 (29)	89,5 (91)
12	101,0 (100)	93,5	5,5 (8)	38,0 (46)	94,0
13	100,0	94,0	8,2 (16)	50,0 (53)	95,0 (94)
14	99,5 (100)	98,0 (96)	10,0 (23)	61,5 (64)	98,0
15		98,0	17,0 (28)	75,0 (80)	96,5 (97)
16			25,5	75,5	100,0
17			35,0 (36)	84,0 (86)	99,0 (99)
18			60,0		
19			65,5 (66)	90,0 (91)	
20			69,5	100,0 (99)	
21			89,5 (88)		
22			95,0		
23			100,0 (98)		
24			98,5		

\* aplicado como la formulación Tordon 22K. \*\* en base al volumen de solución percoladora. 1) Concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en  $\mu\text{g/ml}$ . - 2) Concentración de N-(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en  $\mu\text{g/ml}$ . Los valores expuestos para 25 ppm corresponden a otra experiencia cuyo control presentó una cinética muy semejante a la del control de esta tabla.

Tabla 5. Ecuaciones de las curvas de nitrificación dadas en las figuras 2 y 3, y su análisis estadístico.

Curva	Ecuación*	Coefficiente de variación	Límites de error de los parámetros A k t <sub>1</sub>
Control	$\log \frac{y}{104,56-y} = 0,26(t-6,99)$	5,33	$\pm 3,05 \pm 0,02 \pm 0,17$
25 ppm	$\log \frac{y}{101,95-y} = 0,23(t-7,88)$	4,16	$\pm 2,02 \pm 0,01 \pm 0,13$
50 ppm	$\log \frac{y}{110,02-y} = 0,19(t-19,10)$	8,83	$\pm 5,51 \pm 0,02 \pm 0,35$
200 ppm	$\log \frac{y}{97,99-y} = 0,21(t-15,02)$	7,08	$\pm 4,48 \pm 0,03 \pm 0,31$
400 ppm	$\log \frac{y}{100,77-y} = 0,30(t-8,70)$	7,97	$\pm 2,60 \pm 0,03 \pm 0,18$

\* Ecuación general  $\log y/A-y = k(t-t_1)$ ; siendo "y" la concentración en  $\mu\text{g de N-NO}_3/\text{ml}$  de solución y "t" el tiempo, en días, desde el comienzo de la experiencia.

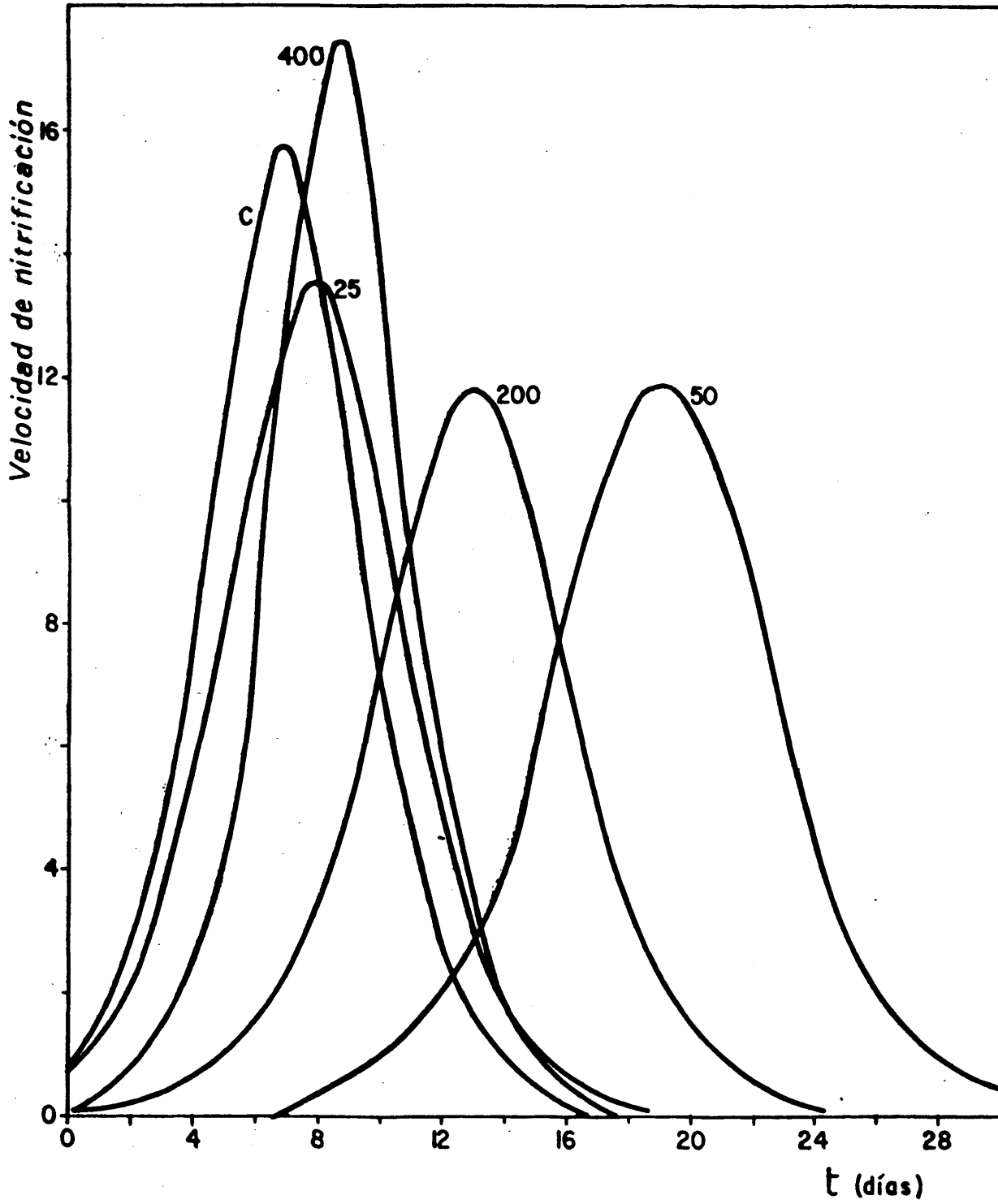


Fig. 4. Efecto de distintas dosis de picloram (formulación Tordon 22K) sobre la velocidad de nitrificación de un sistema de percolación de suelo. Los números sobre las curvas son  $\mu\text{g}$  de picloram/ $\text{ml}$  de solución.

Tabla 6. Parámetros de nitrificación<sup>⊗</sup> deducidos a partir de las curvas de velocidad de nitrificación en función del tiempo correspondientes a distintas dosis de picloram

Dosis (ppm)	V <sub>max</sub>	T <sub>1/2</sub>	1/T <sub>1/2</sub>
0	15,6	4	0,25
25	13,7	4	0,25
50	12,0	15	0,06
200	13,0	8	0,12
400	17,2	5	0,20

⊗ ver apartado 3.1.1. y figura 4

zadas en presencia de las distintas dosis de picloram resultaron en casi todos los casos ligeramente menores que las del control, a la vez que el parámetro  $1/T_{1/2}$ , indicador de la velocidad de proliferación de los nitrificantes, en algunos casos fue sensiblemente disminuido. Sin embargo, a 400 ppm del herbicida, este último parámetro no se vió afectado obteniéndose, además, una velocidad máxima de nitrificación ligeramente superior.

Los niveles de nitritos alcanzados en la solución de percolación, correspondientes a las anteriores experiencias se detallan en la tabla 7 y figura 5 (A y B).

La máxima concentración de nitritos obtenida en el caso del control (en ausencia de herbicida) fue de  $1,1 \mu\text{g. de N-NO}_2^-$  --

Tabla 7. Concentraciones en  $\mu\text{g N} - \text{NO}_2^-/\text{ml}$  en la solución de un sistema de suelo en percolación, para distintas dosis<sup>x</sup> de picloram<sup>\*\*</sup>

Tiempo (días)	Dosis (ppm)				
	0	25	50	200	400
1	0,31	0,46	0,35	0,26	0,13
2	0,63	0,60	0,30	0,38	0,14
3	0,76	0,63	0,21	0,46	0,07
4	0,80	0,46	0,00	0,42	0,00
5	1,01	--	--	--	0,07
6	1,11	0,22	0,00	0,51	0,07
7	0,75	0,14	0,06	0,46	0,00
8	--	0,69	0,28	0,10	--
9	0,40	1,80	0,61	0,22	0,32
10	0,36	0,64	1,60	0,29	0,13
11	0,32	0,44	5,10	0,38	0,11
12	--	--	6,50	1,70	--
13	0,49	0,14	--	--	0,32
14	0,28	0,00	11,00	2,90	0,32
15	0,00	--	14,30	3,50	0,07
16	--	--	17,00	3,50	0,00
17	--	--	17,00	2,50	--
18	--	--	16,70	1,80	--
19	--	--	16,00	1,50	--
20	--	--	6,50	0,70	--
21	--	--	5,80	0,10	--
22	--	--	0,00	0,00	--

<sup>x</sup> en base al volumen de solución percoladora.

- los valores expuestos para 25 ppm corresponden a otra experiencia cuyo control presentó una evolución de nitritos muy semejante a la del control de esta tabla.

<sup>\*\*</sup> aplicado como la formulación Tordon 22K.

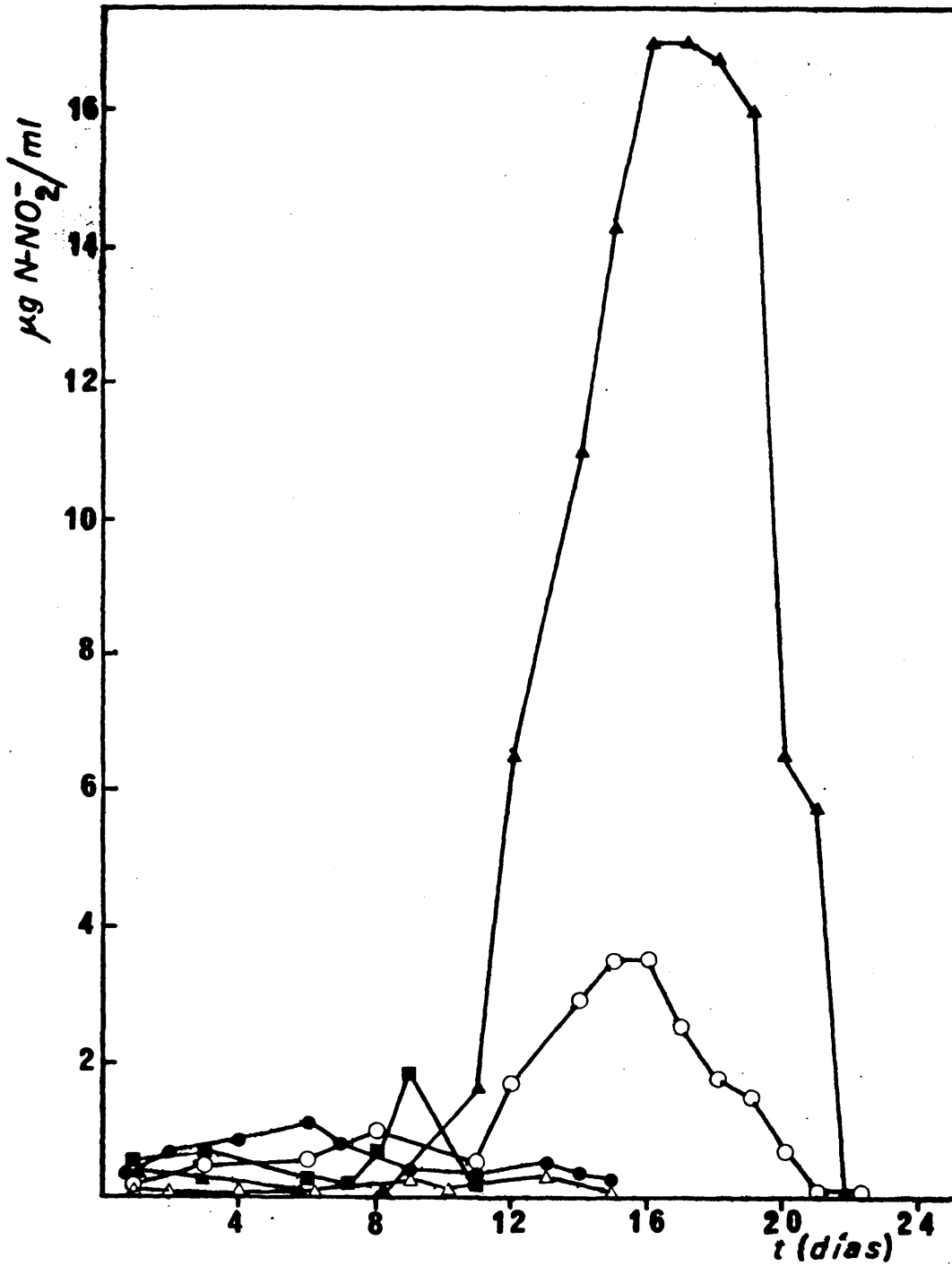


Fig. 5A. Efecto de distintas dosis de picloram (formulación Tordon 22K) en la evolución de nitritos en un sistema de percolación de suelo. ● 0, ■ 25, ▲ 50, ○ 200 y △ 400 µg/ml de solución.

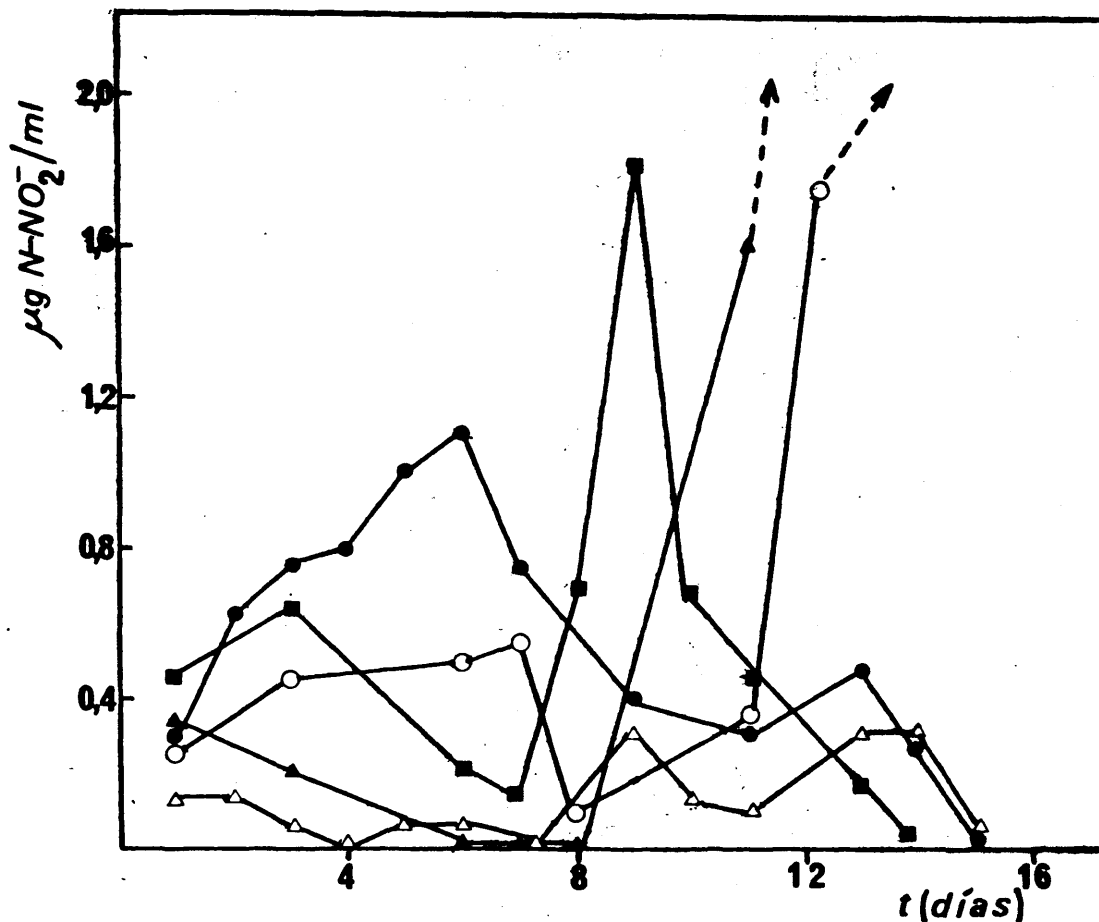


Fig. 5B. Detalle de la figura 5A.

por ml de solución, no alcanzándose este valor únicamente en presencia de 400 ppm de picloram y siendo, por el contrario, superado a las restantes dosis, menores, de ensayo: aproximadamente unas diez y tres veces el valor máximo del control fue obtenido con 50 y 200 ppm respectivamente. Por otra parte, las típicas curvas campaniformes de acumulación de nitritos aparecían a ambas dosis retrasadas en el tiempo con respecto al control.

En otras experiencias repetición, cuyos resultados só-

lo se expondrán parcialmente, se obtuvieron, también, para ciertas dosis de tratamiento de picloram máximos de acumulación de nitritos superiores a los de sus respectivos controles. Así, en la tabla 8 se muestran los resultados de otras dos experiencias para la dosis de 50 ppm (dosis con el mayor efecto en cuanto a acumulación de nitritos). Estas experiencias se han elegido entre las que presentaron la mayor diferencia en la actividad nitrificante de sus respectivos controles, de todas las muestras ensayadas del suelo bajo estudio. Las diferencias observadas, son debidas a la muestra de suelo utilizada en cada experiencia, tomada del mismo lugar pero en distintas ocasiones.

En la experiencia 2 de dicha tabla 8 se obtuvieron, en presencia de 50 ppm del herbicida, valores de acumulación de nitritos muy semejantes a los obtenidos en otra experiencia recogida en la anterior tabla 4, a la vez que los controles respectivos mostraron, también, gran semejanza entre sí. Por otra parte, el nivel máximo de nitritos alcanzado en la solución percoladora correspondiente a la experiencia 3 de la tabla 8, fue a la dosis de 50 ppm de picloram, muy superior a los anteriormente obtenidos, pero significando un aumento de unas diez veces la concentración máxima alcanzada en el respectivo control y resultando así, un factor de multiplicación comparable al obtenido en las otras experiencias.

Tabla 8. Cinética de la nitrificación de un sistema de suelo en percolación en presencia de 50 ppm. de picloram en la solución.

Tiempo (días)	Experiencia 2				Experiencia 3			
	Control		Picloram		Control		Picloram	
	N-NO <sub>2</sub> <sup>-*</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-*</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1	0,25	1,0	0,28	1,0	0,90	4,0	1,00	1,5
2	0,45	1,0	0,13	0,0	1,23	6,5	0,23	0,0
3	0,70	3,0	0,10	-	1,37	10,5	0,00	-
4	0,82	9,5	0,00	0,0	1,50	20,0	0,00	-
5	0,96	11,5	0,00	0,0	--	--	0,00	0,0
6	--	--	--	-	1,70	36,5	0,00	-
7	1,20	36,0	0,00	-	10,10	52,5	--	0,0
8	0,80	50,5	0,10	-	11,20	63,2	0,62	-
9	0,63	68,5	0,15	0,0	7,60	78,0	1,45	0,0
10	0,54	82,0	0,37	0,0	2,50	92,5	3,70	-
11	0,42	92,0	0,65	2,0	0,68	95,0	10,40	0,0
12	0,28	95,0	4,80	4,0	0,82	98,0	17,90	-
13	0,10	98,5	5,75	6,0	0,00	102,0	22,10	2,0
14	0,00	102,0	3,30	10,2	--	102,0	48,20	2,0
15	--	104,0	14,50	16,5	--	--	57,20	3,0
16	--	--	11,40	24,0	--	--	65,00	4,0
17	--	--	--	30,0	--	--	73,30	5,5
18	--	--	--	44,5	--	--	90,50	8,0
19	--	--	0,27	56,5	--	--	--	10,5
20	--	--	0,15	64,7	--	--	74,40	16,0
21	--	--	0,00	76,0	--	--	67,40	25,5
22	--	--	--	92,0	--	--	--	60,0
23	--	--	--	96,0	--	--	22,50	70,0
24	--	--	--	100,0	--	--	10,40	84,0
25	--	--	--	--	--	--	7,60	92,0
26	--	--	--	--	--	--	0,20	100,0

\*  $\mu\text{g/ml}$  de solución percoladora.

### 3.1.2.2. Efectos del 3,6-D

Los efectos del 3,6-D, aplicado como sal de monometanolamina (en formulación comercial) en la cinética de producción de nitratos de suelo en percolación, se resumen en la figura 6 y la correspondiente tabla de valores (tabla 9). Como en el caso del picloram se presentan sólo los resultados de una experiencia elegida entre dos repeticiones por dosis, ya que se obtuvieron en sendas repeticiones, efectos semejantes si se tienen en cuenta las variaciones presentadas por los respectivos controles entre sí.

La expresión matemática de las curvas que aparecen en la figura 6 y su análisis estadístico vienen dados en la tabla 10.

Como se puede observar la formulación de 3,6-D utilizada produjo estimulación de la nitrificación a las concentraciones de 100 y 500 ppm en producto activo, referidas al volumen de solución de percolación, pero ya a 1000 ppm se presentó retardo en la iniciación del proceso.

Las curvas estimadas de velocidad de nitrificación en función del tiempo, así como  $V_{max}$  y  $1/T_{1/2}$  para la misma experiencia, se presentan en la figura 7 y tabla 11 respectivamente, donde se refleja, más claramente, como fue afectada la nitrificación según la dosis de herbicida aplicado. Así a 100 y 500 ppm se superó la velocidad máxima de nitrificación con respecto al control sin herbicida, así como  $1/T_{1/2}$ , considerado como parámetro indica

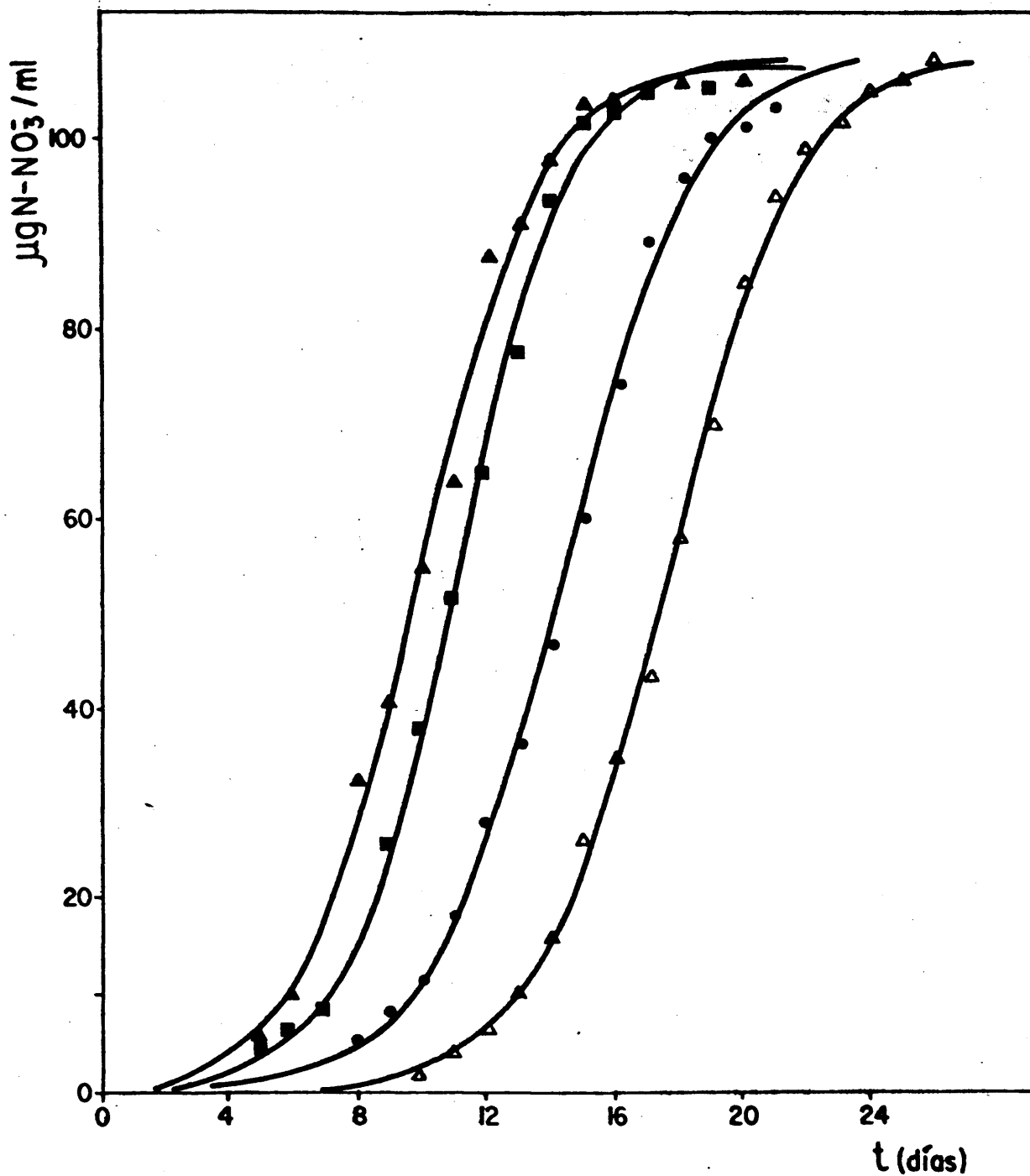


Fig. 6. Efecto de distintas dosis de 3,6-D (formulación Lontrel) en la cinética de la nitrificación de un sistema de percolación de suelo. ● 0, ▲ 100, ■ 500 y △ 1000  $\mu\text{g/ml}$  de solución. El análisis estadístico de los datos representados se recoge en la tabla 10.

Tabla 9 . Cinética de la nitrificación de un sistema de suelo en percolación en presencia de distintas dosis de 3,6-D<sup>Ⓢ</sup>.

Tiempo (días)	Dosis (ppm) <sup>ⓈⓈ</sup>			
	0	100	500	1000
1	1,0 <sup>1</sup>	1,5	1,2	1,0
3	1,2	1,2	1,5	1,2
5	0,5	6,0	4,0	0,0
6	0,5 (2,0) <sup>2</sup>	9,0 (20)	6,0 (12)	0,5
7	-	-	8,5	-
8	5,0 (13)	33,0 (52)	-	-
9	7,5 (22)	40,5 (60)	25,5 (40)	0,5 (2,0)
10	11,0	55,0	38,0	1,5
11	18,0 (38)	64,0 (88)	52,5 (54)	3,5 (14)
12	28,0	87,5	65,0	6,0
13	35,5 (80)	91,0 (94)	77,0 (78)	10,0 (28)
14	46,0	98,0	93,0	16,5
15	60,5 (82)	104,0 (104)	102,0 (102)	26,0 (56)
16	74,0	104,0	103,0	37,5
17	89,5 (90)	-	104,0 (104)	45,5 (86)
18	96,0	106,0	-	58,0
19	100,0 (102)	108,0 (108)	104,0 (104)	70,0 (84)
20	101,0	106,0	108,0	85,0
21	103,0	-	-	93,5 (98)
22				99,0
23				102,0 (104)
24				105,0
25				106,0
26				108,0

Ⓢ aplicado como la formulación Lontrel 300.

ⓈⓈ en base al volumen de solución percoladora.

1) Concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en µg/ml.

2) Concentración de N-(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en µg/ml.

Tabla 10. Ecuaciones de las curvas de nitrificación dadas en la figura 6 y su análisis estadístico.

Curva	Ecuación	Coefficiente de variación	Límites de error de los parámetros A k t <sub>1</sub>
Control	$\log \frac{y}{109,12-y} = 0,21(t-15,40)$	3,97	$\pm 2,00 \pm 0,01 \pm 0,12$
100 ppm	$\log \frac{y}{107,97-y} = 0,24(t-9,87)$	4,52	$\pm 1,67 \pm 0,02 \pm 0,13$
500 ppm	$\log \frac{y}{108,23-y} = 0,25(t-11,14)$	4,16	$\pm 1,93 \pm 0,01 \pm 0,12$
1000 ppm	$\log \frac{y}{110,04-y} = 0,21(t-17,65)$	3,19	$\pm 0,94 \pm 0,01 \pm 0,06$

\* Ecuación general  $\log y/A-y = k(t-t_1)$ ; siendo "y" la concentración en  $\mu\text{g de N-NO}_3/\text{ml}$  de solución y "t" el tiempo, en días, desde el comienzo de la experiencia.

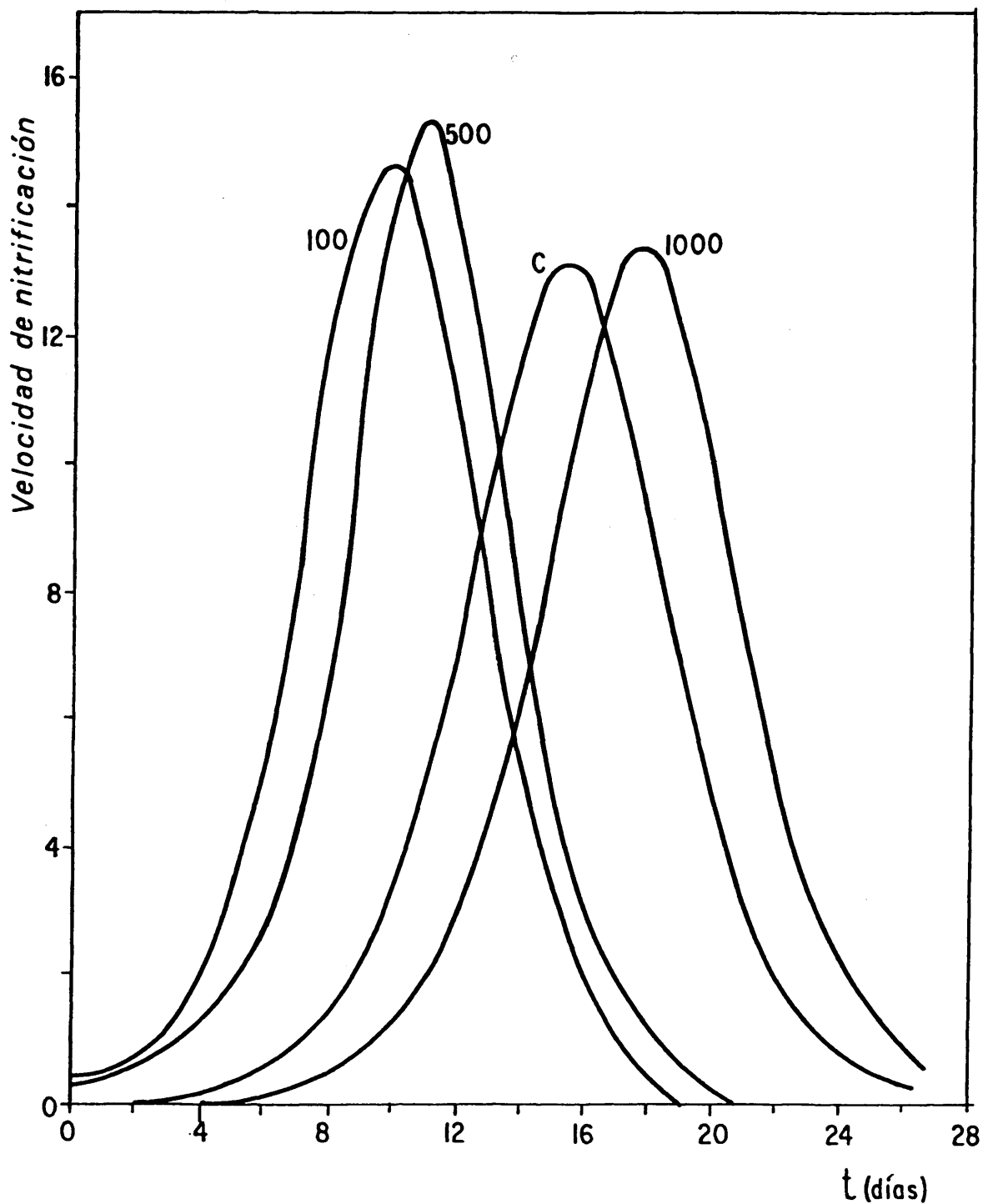


Fig. 7. Efecto de distintas dosis de 3,6-D (formulación Lontrel) sobre la velocidad de nitrificación de un sistema de percolación de suelo. Los números sobre las curvas son  $\mu\text{g}$  de 3,6-D/ml de solución.



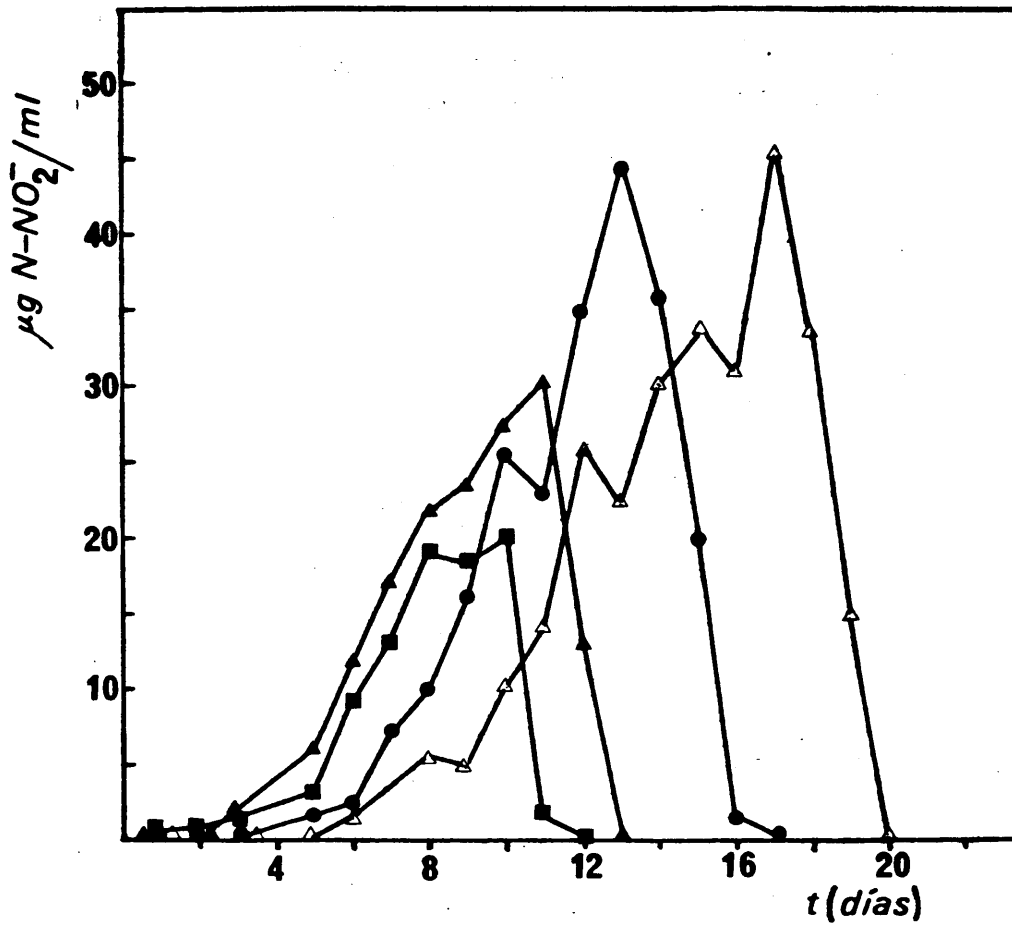


Fig. 8. Efecto de distintas dosis de 3,6-D (formulación Lonrel) en la evolución de nitritos en un sistema de percolación de suelo. ● 0, ■ 100, ▲ 500 y ▼ 1000 µg/ml de solución.

cida. Sin embargo, a dosis de 1000 ppm de 3,6-D se produjo retraso de la curva de acumulación de nitritos, con un valor máximo semejante al del control o ligeramente inferior como ocurrió en otra experiencia repetición no representada.

Tabla 12. Concentraciones en  $\mu\text{g N} - \text{NO}_2^-/\text{ml}$  en la solución de un sistema de suelo en percolación, para distintas dosis<sup>\*</sup> de 3,6-D<sup>\*\*</sup>

Tiempo (días)	Dosis (ppm)			
	0	100	500	1000
1	0,09	0,25	0,25	0,15
2	0,10	0,80	0,35	0,15
3	0,13	1,30	1,50	0,15
5	1,50	3,20	6,00	0,15
6	2,50	9,00	11,40	0,15
7	7,20	13,00	16,90	1,60
8	10,00	19,00	21,50	5,50
9	16,00	18,20	23,40	5,00
10	25,70	20,00	27,50	10,00
11	23,00	1,70	30,20	14,00
12	35,00	0,00	12,70	26,00
13	45,00	--	0,00	22,80
14	36,00	--	--	30,00
15	20,00	--	--	34,00
16	1,60	--	--	31,50
17	0,00	--	--	46,00
18	--	--	--	34,00
19	--	--	--	15,20
20	--	--	--	0,00

\* La dosis viene dada en base al volumen de solución percoladora  
 \*\* aplicado como la formulación Lontrel 300.

### 3.1.3. Efectos en la viabilidad y evolución de la población nitrificante de suelo.

Los efectos de la presencia de herbicida en la proliferación y viabilidad de los dos tipos de microorganismos autotrofos, oxidantes de  $\text{NH}_4^+$  y oxidantes de  $\text{NO}_2^-$ , fue estudiada en muestras de suelo incubado en laboratorio bajo las condiciones que se detallan en el apartado 2.1.6. Los resultados de los recuentos de nitrificantes viables (fundamentalmente autotrofos), según el tiempo transcurrido desde el momento de aplicación del herbicida y según la dosis del mismo, son mostrados en la figura 9.

No se observó diferencia significativa en la magnitud de la población viable nitrificante dentro del periodo de treinta días de incubación del suelo y bajo ninguno de los tratamientos herbicidas. Sólo se produjo un ligero aumento después de una semana de incubación en presencia de 100 ppm de 3,6-D, lo que pudiera responder a un adelanto en el comienzo de la proliferación de la flora nitrificante. Sin embargo, la flora nitrificante se mantuvo, después de una semana de incubación, a niveles inferiores con respecto al control sin herbicida, sobre todo, a las dosis de ensayo mayores de cada uno de los herbicidas. A 100 ppm de 3,6-D correspondió la reducción mínima, sin que fuese significativamente apreciable hasta el recuento realizado a los treinta días de incubación.

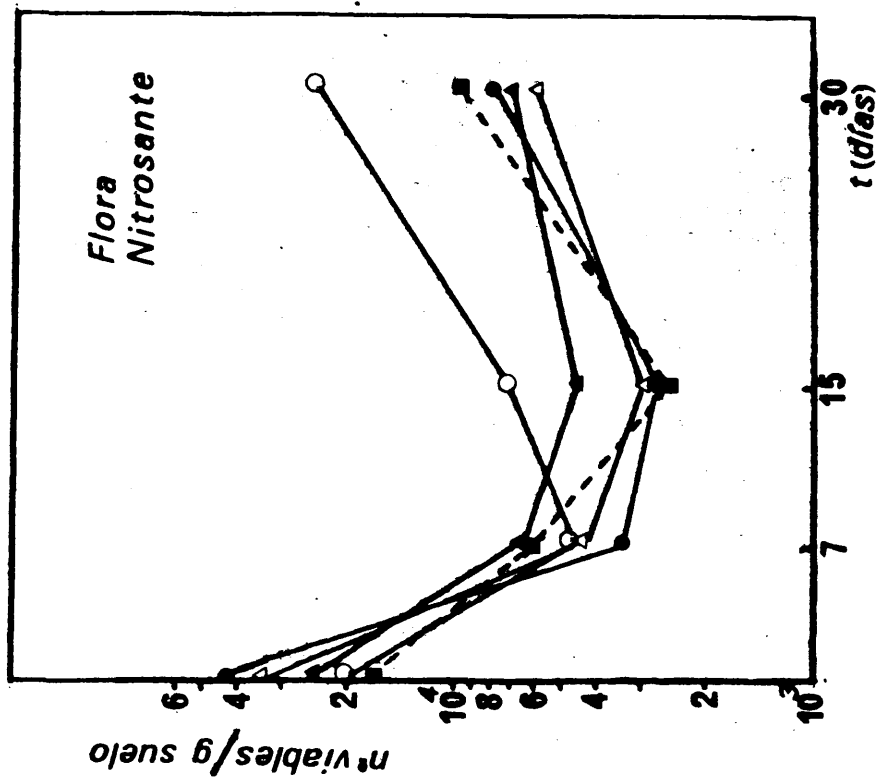
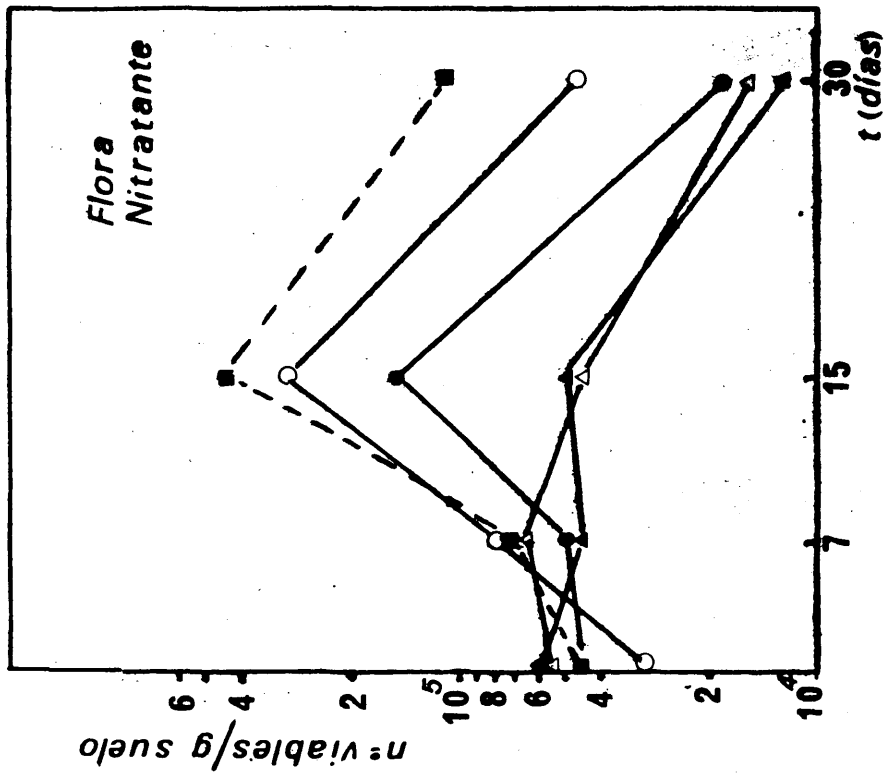


Fig. 9. Evolución de la población nitrificante en suelo incubado bajo condiciones de laboratorio en presencia de picloram (● 50, ▲ 400 µg/ml) y 3,6-D (○ 100, △ 1000 µg/ml). --- ■ Control (0 µg/ml). Ambos herbicidas se aplicaron como formulaciones, Tordon 22K y Lontrel respectivamente y las dosis vienen dadas en base a la fase líquida del suelo.

3.1.4. Efectos en bacterias autotrofas nitrificantes en cultivo puro

Los dos herbicidas objeto de estudio se ensayaron para ver sus efectos en el crecimiento de las cepas de colección Nitrosomonas europaea y Nitrobacter agilis a las mismas concentraciones en producto activo que las escogidas para los ensayos de nitrificación de suelo.

La mayoría de estos ensayos con cultivos puros se llevaron a cabo con el producto puro, pero se incluyen, también, algunas experiencias con las formulaciones de cada uno de los herbicidas que habían sido empleados en los estudios de nitrificación con suelo.

El crecimiento y la actividad nitrosante o nitratante, según la especie autotrofa nitrificante de que se trate, están íntimamente relacionados por ser estas actividades la única fuente de obtención de energía en este tipo de bacterias. Así, los efectos de los herbicidas han sido estimados a través de la evaluación de la actividad nitrificante en presencia de los compuestos y cuando las cepas eran cultivadas en distintos medios. En las figuras 10 y 11 se comparan las actividades de N. europaea y N. agilis respectivamente, según los distintos medios y condiciones de cultivo en que se realizaron los ensayos con herbicidas. Los medios de cultivo elegidos fueron los respectivos medios de Winogradsky para Nitrosomonas y Nitrobacter utilizados anteriormente en los ensayos de nitrificación de suelo y, preferentemente,

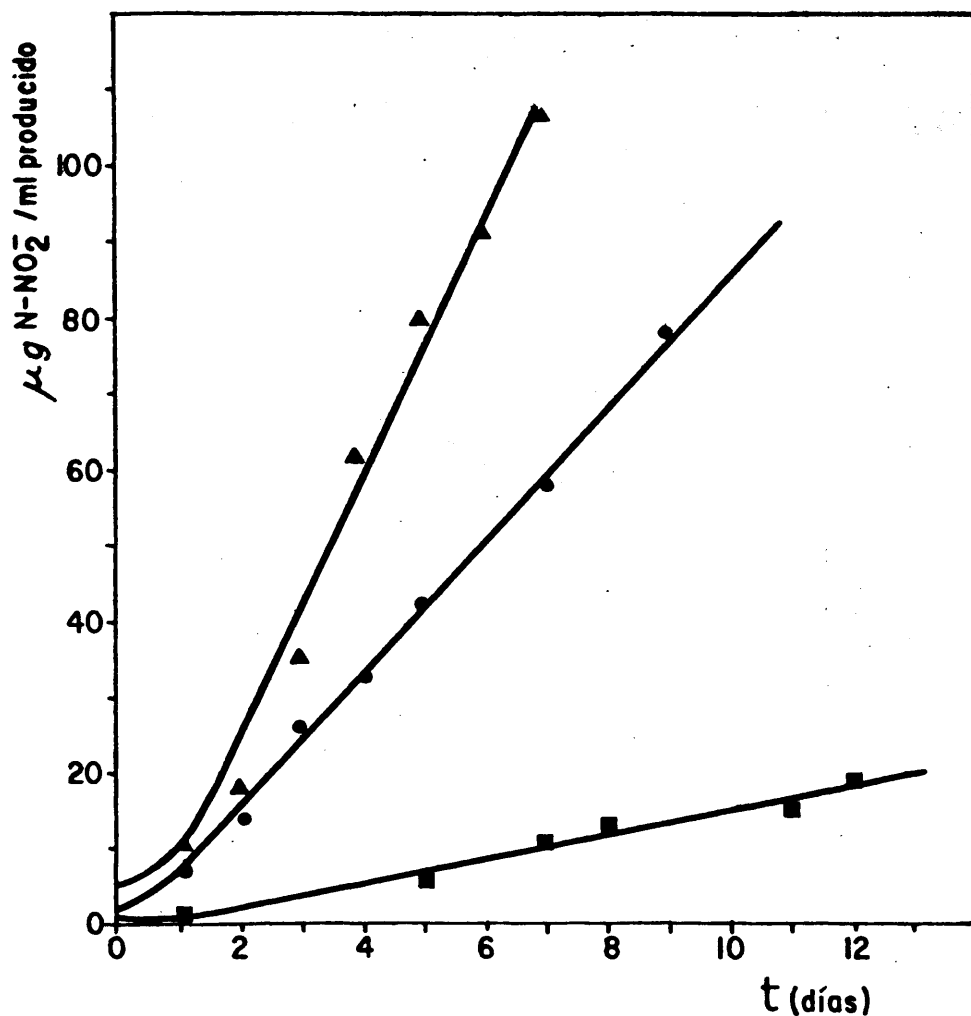


Fig. 10. Crecimiento de Nitrosomonas europaea según el medio de cultivo y condiciones: ▲ medio Skinner y Walker, agitación; ● idem, estático; ■ medio de Winogradsky, estático. Otros detalles en Material y Metodos 2.1.7.

los medios considerados óptimos para el desarrollo de cada una de las cepas bajo estudio. Las actividades obtenidas resultaron ser distintas según las condiciones y medios de cultivo, en parte, - quizás, a causa de la capacidad de los últimos para mantener el - pH, factor considerado de gran influencia. Los valores de pH iniciales fueron similares en todos los casos y los finales para ca-

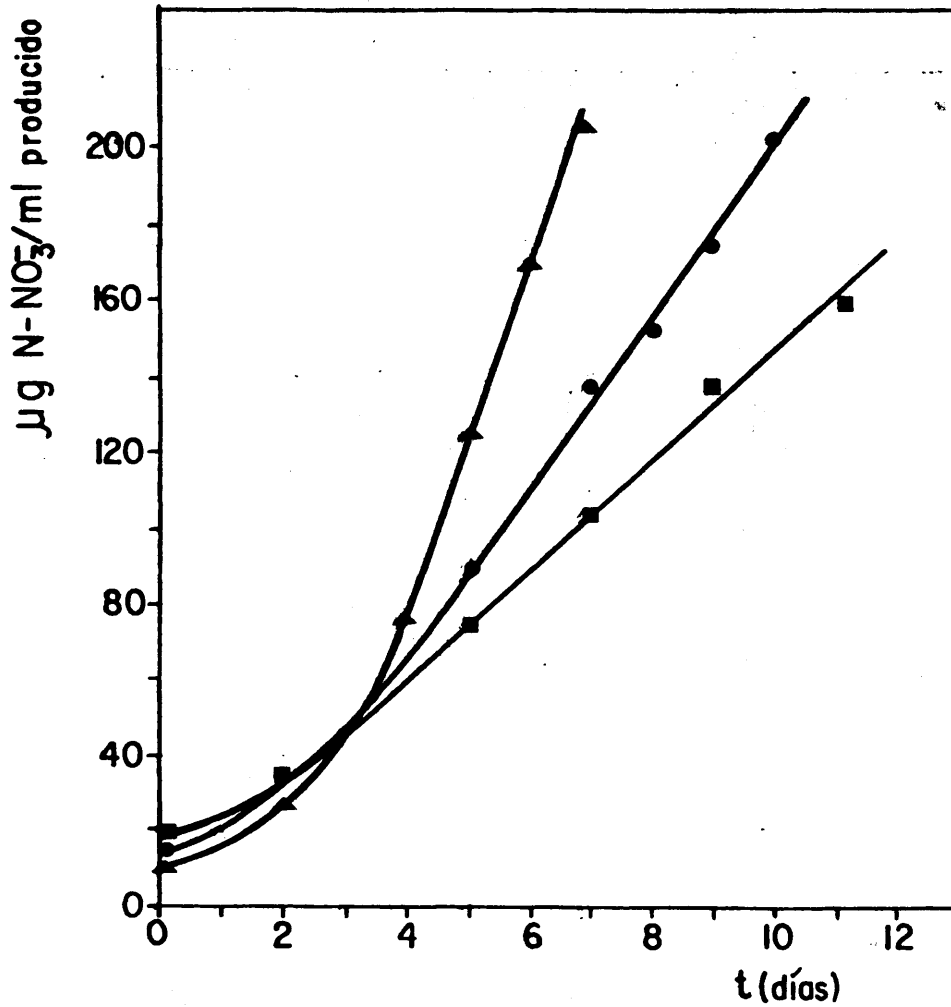


Fig. 11. Crecimiento de Nitrobacter agilis según el medio y condiciones de cultivo:  $\blacktriangle$  medio ATCC nº 96, agitación;  $\bullet$  idem, estático;  $\blacksquare$  medio Winogradsky, estático. Otros de talles en Material y Métodos 2.1.7.

da cultivo están incluidos en las correspondientes tablas 13 a - 18 (ver controles en cada caso). Por otra parte, ciertos catio- nes, a concentraciones críticas, pueden variar los efectos tóxi- cos de algunos compuestos. En este sentido, los medios utilizados tienen algunas diferencias cuantitativas, aunque no cualitativas

Tabla 13. Actividad\* de Nitrosomonas europaea cultivada en agitación en medio Skinner y Walker bajo distintos tratamientos herbicidas.\*\*

Tiempo (días)	Control	Picloram (ppm)					3,6-D (ppm)				
		50	200	400	100	500	1000				
0	0,36	0,39	0,36	0,39	0,36	0,36	0,34				
1	1,05	1,10	1,04	1,04	1,02	1,08	1,10				
2	2,62	2,88	2,18	2,16	2,80	2,82	2,50				
3	5,80	--	5,30	5,05	6,05	5,60	5,00				
4	9,10	8,82	8,40	8,64	8,66	--	8,35				
5	28,8	27,2	27,5	26,8	28,5	28,6	27,20				
6	38,5	40,6	38,0	37,4	39,2	38,0	37,5				
7	63,8	62,4	61,3	60,5	62,5	62,9	61,0				
8	81,2	81,1	80,5	78,8	83,2	81,5	81,4				
9	93,5	93,1	94,0	92,4	94,3	96,0	92,0				
10	110,0	110,0	111,0	110,0	110,0	111,0	110,0				

\*  $\mu\text{g. N-NO}_2^-$  producido/ml.

\*\* aplicado como producto puro.

Tabla 14. Actividad\* de Nitrosomonas europaea, en cultivo estático en medio Skinner y Walker, según los distintos tratamientos herbicidas\*\*.

Tiempo (días)	Control	Picloram (ppm)		3,6-D (ppm)	
		50	400	100	1000
0	4,2	4,0	4,2	4,4	4,4
1	8,0	7,8	8,2	8,4	8,2
2	14,3	13,5	14,5	14,6	14,5
3	26,5	26,0	26,8	26,3	25,8
4	33,3	33,3	32,8	33,8	30,5
6	41,1	43,3	42,4	43,6	42,0
8	62,5	63,2	62,2	63,5	61,5
12	105	103	104	104	103

\*  $\mu\text{g N-NO}_2^-$  producido/ml.

\*\* aplicados como producto técnico puro.

Las actividades de Nitrosomonas sp. y Nitrobacter sp. en presencia de herbicida en los distintos medios y condiciones, se recogen en las tablas anteriores 13 y 14 y siguientes (15 a 18).

La actividad de N. europaea en medio Winogradsky (tabla 15) no se siguió más allá del periodo de incubación de 21 días, a pesar de no haber sido agotado aún el sustrato energético, pues se había llegado a un pH 6 en el medio de cultivo, valor por debajo del cual la actividad resultó despreciable; sin embargo, en el medio de Skinner y Walker, el pH fue periódicamente ajustado a 7,5

Tabla 15. Actividad <sup>⊗</sup> de Nitrosomonas europaea en cultivo estático en medio Winogradsky bajo distintos tratamientos de picloram y 3,6-D.

Tiempo (días)	Control	Picloram (400 ppm)		3,6-D (1000 ppm)	
		P.puro <sup>1</sup>	Formul. <sup>2</sup>	P.puro <sup>1</sup>	Formul. <sup>2</sup>
1	0,94	1,04	0,83	0,97	0,99
3	2,3	2,7	0,83	2,1	2,4
5	6,2	7,2	0,83	5,4	6,0
6	10,5	10,2	0,85	6,0	9,9
7	12,1	14,8	0,99	8,7	12,8
8	15,2	17,7	1,4	11,4	15,2
9	16,6	18,2	--	12,4	16,8
16	22,8	23,9	1,4	22,1	28,1
20	32,2	33,8	1,4	28,1	30,1
22	32,9	34,1	1,4	28,6	30,4
pH final <sup>⊗⊗</sup>	6,2	6,1	7,4	6,1	6,1

⊗  $\mu\text{g N-NO}_2^-$  producido/ml.

⊗⊗ En todos los casos el pH inicial fue de 7,5.

1) Producto técnico puro.

2) Formulación: Tordon 22K (sal potásica de picloram) y Lontrel (sal de etanolamina de 3,6-D).

Tabla 16. Actividad\* de Nitrobacter agilis cultivado en agitación en medio ATCC, según - los distintos tratamientos herbicidas.\*\*

Tiempo (días)	Control	Picloram (ppm)				3,6-D (ppm)			
		50	200	400	800	100	500	1000	1000
0	8	8	8	8	8	8	8	8	8
1	12	11	9	9	12	10	9	9	9
2	20	20	14	12	22	18	16	16	16
3	48	46	34	32	48	46	36	36	36
4	76	82	80	78	86	82	72	72	72
5	132	142	128	126	146	144	146	146	146
6	178	210	210	206	212	210	210	210	210
7	196	212	212	210	214	212	210	210	210
8	214	216	214	212	214	214	212	212	212

pH final cultivo

7,5	7,4	7,4	7,0	7,5	7,2	6,6
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

\*  $\mu\text{g N-NO}_3^-$  producido/ml.

\*\* aplicados como producto técnico puro. El pH inicial, en todos los casos, fue de 7,7.

Tabla 17. Actividad\* de Nitrobacter agilis en cultivo estático en medio ATCC según los distintos tratamientos herbicidas\*\*.

Tiempo (días)	Control	Picloram (ppm)		3,6-D (ppm)	
		50	400	100	1000
0	10	9	10	10	11
1	13	13	11	13	11
2	20	22	12	22	12
3	36	42	16	44	14
4	52	57	23	56	21
5	69	--	44	74	42
6	86	108	68	112	70
8	138	168	132	176	144
9	152	180	168	196	176
11	184	--	212	216	212
12	202	216	216	220	218
20	220	220	220	220	220
pH final cultivo	7,5	7,4	7,0	7,5	6,6

\*  $\mu\text{g N-NO}_3^-$  producido/ml.

\*\* aplicados como producto técnico puro.

- El pH inicial, en todos los casos, fue de 7,7.

Tabla 18. Actividad<sup>⊗</sup> de Nitrobacter agilis en cultivo estático - en medio Winogradsky bajo distintos tratamientos de picloram y - 3,6-D.

Tiempo (días)	Control	Picloram (400 ppm)		3,6-D (1000 ppm)	
		P.puro <sup>1</sup>	Formul. <sup>2</sup>	P.puro <sup>1</sup>	Formul. <sup>2</sup>
1	18	11	16	10	12
2	26	13	--	10	--
3	38	19	16	18	15
4	49	25	--	21	--
5	65	28	--	24	22
6	76	36	16	50	40
7	--	56	--	58	50
8	104	76	--	72	68
10	138	132	18	114	110
15	178	186	18	184	182
17	200	222	18	222	220
21	232	232	18	232	232
pH final <sup>⊗⊗</sup>	7,7	7,5	7,4	7,4	7,7

⊗  $\mu\text{g N-NO}_2^-$  producido/ml.

⊗⊗ En todos los casos el pH inicial fue 7,7.

1) Producto técnico puro.

2) Formulación: Tordon 22K (sal potásica de picloram) y Lontrel (sal de etanolamina de 3,6-D).

y la actividad fue seguida hasta el agotamiento del  $\text{NH}_4^+$  del medio, (tablas 13 y 14). En ninguno de los medios y con independencia de las condiciones del cultivo, el picloram y 3,6-D, hasta las respectivas dosis de máxima solubilidad en agua, afectaron el crecimiento de N.europaea, obteniéndose únicamente una pequeña prolongación de la latencia en presencia de 1000 ppm de 3,6-D cuando la bacteria fue cultivada en medio Winogradsky. La formulación de 3,6-D ensayada (1000 ppm en producto activo) tampoco afectó a esta cepa, sin embargo, 400 ppm de picloram, como formulación Tordon 22K, produjo una total inhibición (tabla 15).

Igualmente la actividad de Nitrobacter agilis fue inhibida completamente por la citada formulación de picloram, mientras que la formulación de 3,6-D sólo produjo prolongación de la fase de latencia (tabla 18).

Por otra parte, N.agilis presentó a partir de distintas dosis según el herbicida, periodos de latencia mayores que en ausencia de los mismos, más patentes en el medio Winogradsky. Después de este periodo de adaptación se observó para todos los tratamientos un cierto estímulo de la oxidación de  $\text{NO}_2^-$ , con independencia del medio y condiciones de cultivo (tablas 16,17 y 18).

En las tablas, a las que nos hemos referido, se incluyen los pH finales de los medios de cultivo, así como el pH inicial en cada caso; siendo de destacar que este último fue muy similar en los distintos medios y se mantuvo prácticamente invariable según la dosis y herbicida añadido.

3.2. Efectos de los herbicidas picloram y 3,6-D sobre Rhizobium spp.

3.2.1. Características de las cepas nativas utilizadas en los ensayos

La inoculación con suelo en una amplia gama de especies de leguminosas (según Material y Métodos 2.2.1.) produjeron nódulos efectivos en garbanzo (Cicer arietinum), loto (lotus pedunculatus), serradella (Ornithopus compressus) y tréboles (Trifolium repens y distintas variedades de T.subterraneum). Aislados los respectivos rizobios nodulares se han seleccionado y utilizado

Tabla 19. Clasificación de las cepas nativas de Rhizobium usadas en las experiencias.

Cepa	Huésped	Especie *	Grupo de inoculación
Ts-7	Trébol subterráneo	R.trifolii	R.trifolii-R.leguminosarum
Tr-3	Trébol blanco	R.trifolii	R.trifolii-R.leguminosarum
Ca-7	Garbanzo	R.sp.	Grupo Heterogeneo
B-7	Loto	R.sp.	Grupo "Cowpea"
B-12	Serradella	R.sp.	R.lupini

\* R. sp.: según Vincent 1977, no tienen asignada especie definida

para las experiencias con herbicidas, cinco cepas pertenecientes a varias especies de Rhizobium y que según la clasificación de Vincent (1977) (apartado 1.3.2.1.), se incluyen en diversos grupos

de inoculación cruzada (tabla 19) teniendo en cuenta algunas de las características fisiológicas (leguminosa-huésped y velocidad de crecimiento) presentadas en la tabla 20, la cual también incluye otras características diferenciales de las cepas seleccionadas. Además cada cepa solo fue capaz de nodular su leguminosa huésped correspondiente.

Tabla 20. Características fisiológicas de las cepas nativas de Rhizobium

cepa	Velocidad crecimiento (horas <sup>-1</sup> )	Cambios en <sup>1</sup> pH del medio	Acción sobre <sup>2</sup> leche torna solada	Producción <sup>3</sup> mucílago
Tr-3	0.14	ac.	alcal.	ab.
Ts-7	0.12	ac.	alcal.	ab.
Ca-7	0.092	ac.	ac. zona de suero	ab.
B-7	0.049	alcal.	alcal.	es.
B-12	0.045	alcal.	alcal.	es.

1 acidificación o alcalinización, significa que las cepas varían el pH del medio de cultivo (E.M) por debajo o por encima del pH inicial 6,8

2 ligera alcalinización o acidificación

3 abundante o escaso (ab,es), según observación en medio sólido (EMA)

### 3.2.2. Toxicidad de los herbicidas en medio sólido

Las experiencias en medio sólido se realizaron fundamentalmente en orden al establecimiento del nivel de toxicidad de los herbicidas bajo estudio en comparación con los resultados --

Tabla 21. Inhibición<sup>✕</sup> del crecimiento de Rhizobium spp. en medio sólido por distintas dosis de picloram aplicado sobre discos de papel Whatman.

Dosis ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )	Cepa				
	Ts-7	Tr-3	Ca-7	B-7	B-12
2.000	7,5	7,7	8,0	4,0	4,2
1.500	3,7	4,0	4,2	3,2	3,2
1.000	3,7	3,0	3,2	2,0	2,0
750	0	0	0	0	0

✕ Halo de inhibición alrededor del disco, en mm.

Tabla 22. Inhibición<sup>✕</sup> del crecimiento de Rhizobium spp. en medio por distintas dosis de 3,6-D aplicado sobre discos de papel - Whatman.

Dosis ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )	Cepa				
	Ts-7	Tr-3	Ca-7	B-7	B-12
2.000	8,5	9,0	12,0	6,5	7,0
1.500	7,0	7,0	6,5	5,0	5,2
1.000	3,5	3,2	3,2	2,0	2,5
750	0	0	0	0	0

✕ Halo de inhibición alrededor del disco, en mm.

obtenidos por otros autores con otros compuestos herbicidas en el género Rhizobium, o en otros grupos bacterianos ya que fundamentalmente ha sido la determinación de la zona de inhibición del crecimiento, alrededor del punto de aplicación del herbicida, el parámetro de toxicidad más frecuentemente considerado. Asimismo se llevaron a cabo con el fin de comparar las sensibilidades relativas de las distintas cepas ensayadas.

Nuestros resultados en este sentido se recogen en las tablas 21 y 22 . La toxicidad del 3,6-D parece ser ligeramente superior a la del picloram en todas las cepas bajo ensayo, aunque habría que tener en cuenta el descenso relativo del pH del medio de cultivo por la introducción de los herbicidas, además de otras propiedades fisicoquímicas con implicación en la magnitud de la inhibición observada.

La sensibilidad relativa de estas cepas fue variable estableciéndose grupos de diferente inhibición. Así las cepas Ts-7 y Tr-3, ambas de R.trifolii, presentaron sensibilidad semejante. Otro grupo lo constituyen las cepas B-7 y B-12, que por otra parte, fueron las menos sensibles. La cepa Ca-7 presentó, claramente, mayor sensibilidad que las restantes cepas a la dosis mayor de 3,6-D ensayada.

### 3.2.3. Efectos en el crecimiento

La respuesta en el crecimiento de Rhizobium spp. a la presencia de herbicida fue seguida en medio líquido y en condiciones de cultivo óptimas (pH 6,8 y aireación). Las dosis de ensayo fueron distintas, según el herbicida, estando comprendidas dentro de los límites respectivos de solubilidad en agua.

Como resultados representativos de los obtenidos en las cinco cepas utilizadas en este trabajo, expondremos los correspondientes a tres de ellas.

En las figuras 12 y 13 se muestra el crecimiento de la cepa B-7 en medio Rh<sub>6</sub> y en presencia de distintas dosis de picloram ó 3,6-D respectivamente. Además, la figura 14 recoge las curvas de crecimiento para esta cepa, correspondientes sólo a las mayores dosis de ensayo de cada uno de los herbicidas; representándose las absorbancias en escala logarítmica, lo que permite poner en relieve algunos aspectos del efecto producido en el crecimiento e hizo posible la estimación de los periodos de latencia recogidos en la tabla 23. La cepa B-12 de características semejantes a la anterior (tablas 19 y 20), presentó el mismo comportamiento frente a los dos herbicidas (tabla 23).

De la misma manera, la figura 15, junto con los datos incluidos en la tabla 23, resume los resultados obtenidos en la cepa Ts-7, representante de las cepas de R. trifolii objeto de ensayo, ya que Tr-3 presentó idéntica respuesta frente a los herbicidas.

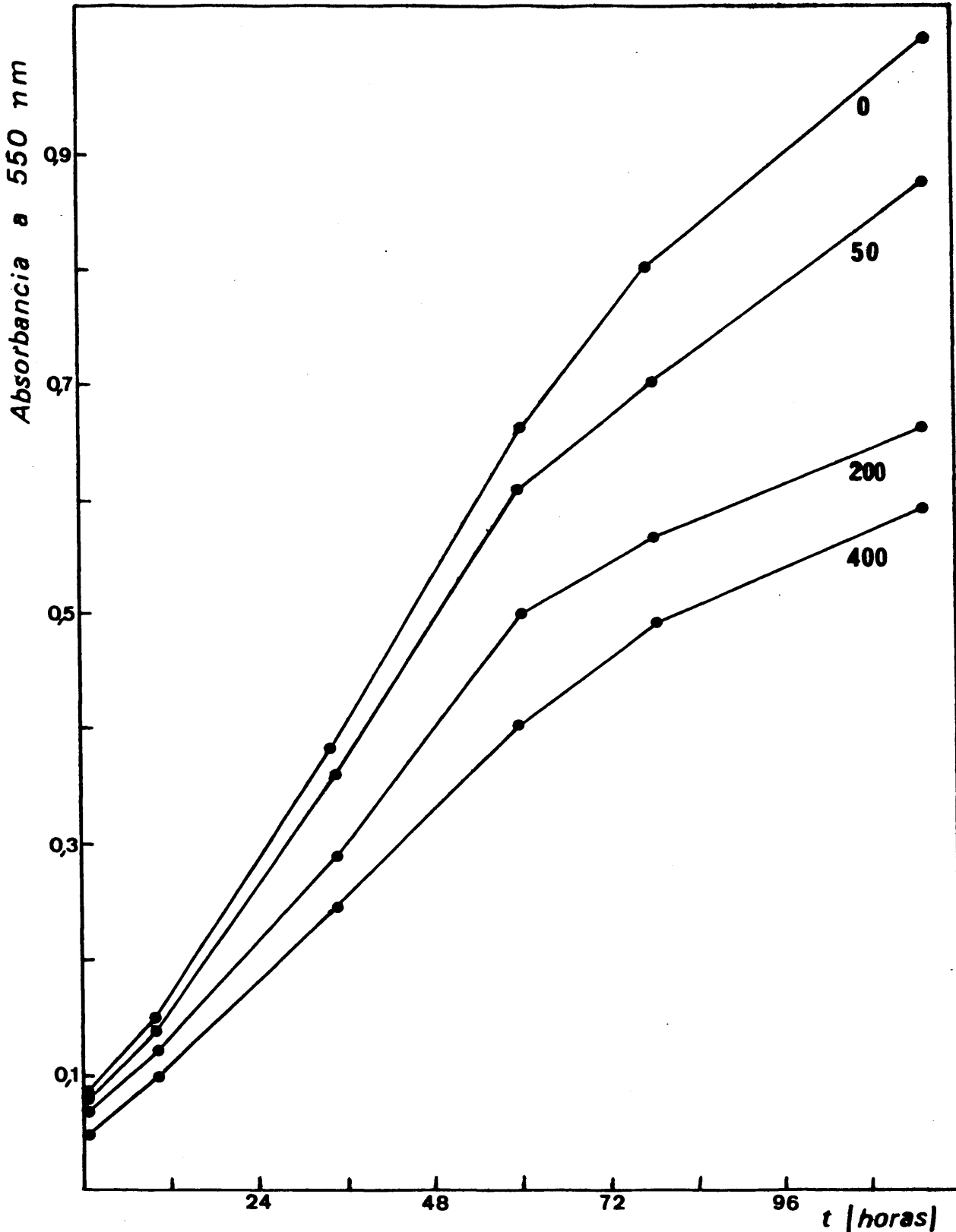


Fig. 12. Crecimiento de la cepa B-7 en presencia de picloram a las concentraciones, expresadas en ppm, que se indican en las curvas. El pH inicial del medio fue 6,8.

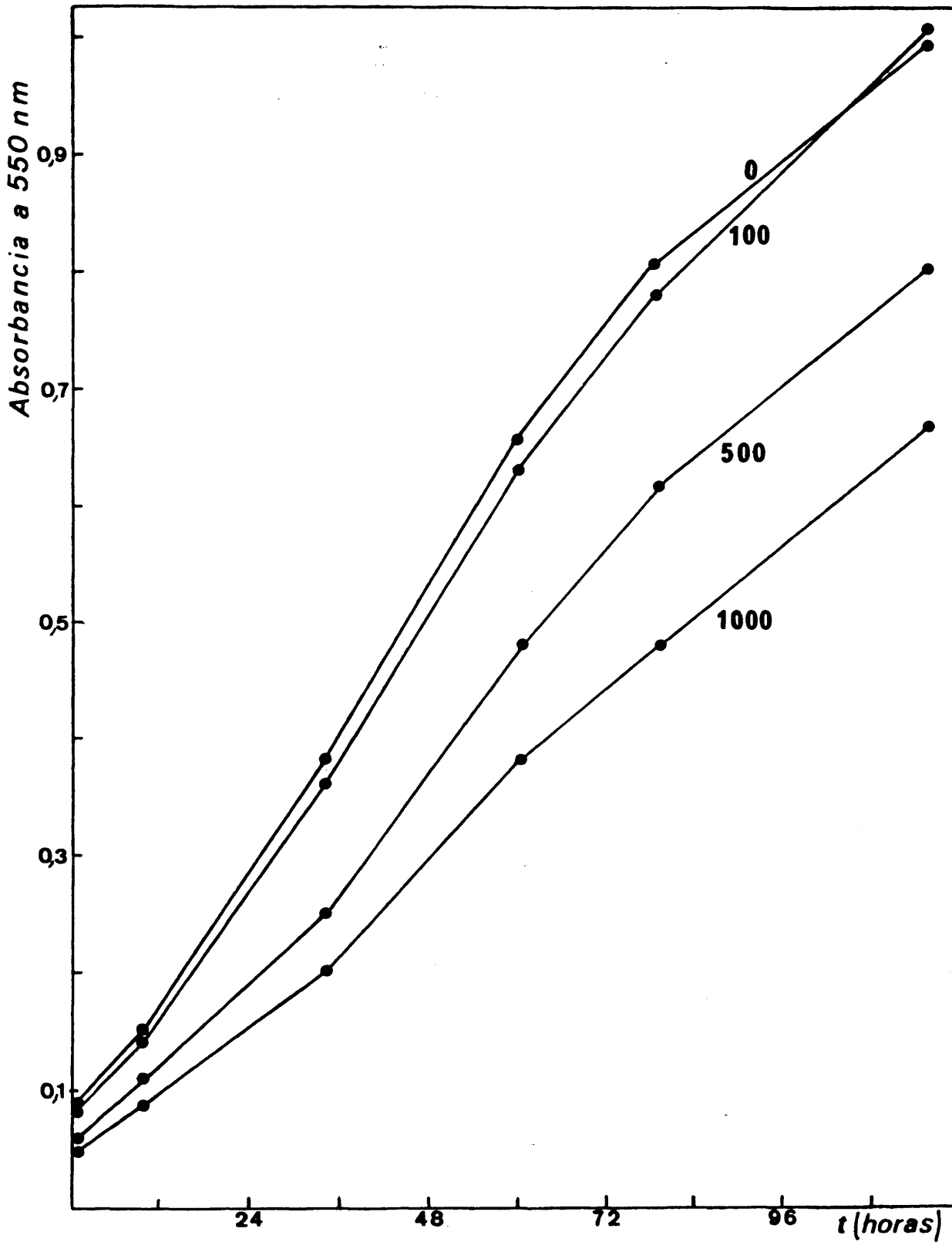


Fig. 13. Crecimiento de la cepa B-7 en presencia de 3,6-D a las -  
concentraciones, expresadas en ppm, que se indican en las curvas.  
El pH inicial del medio fue 6,8.

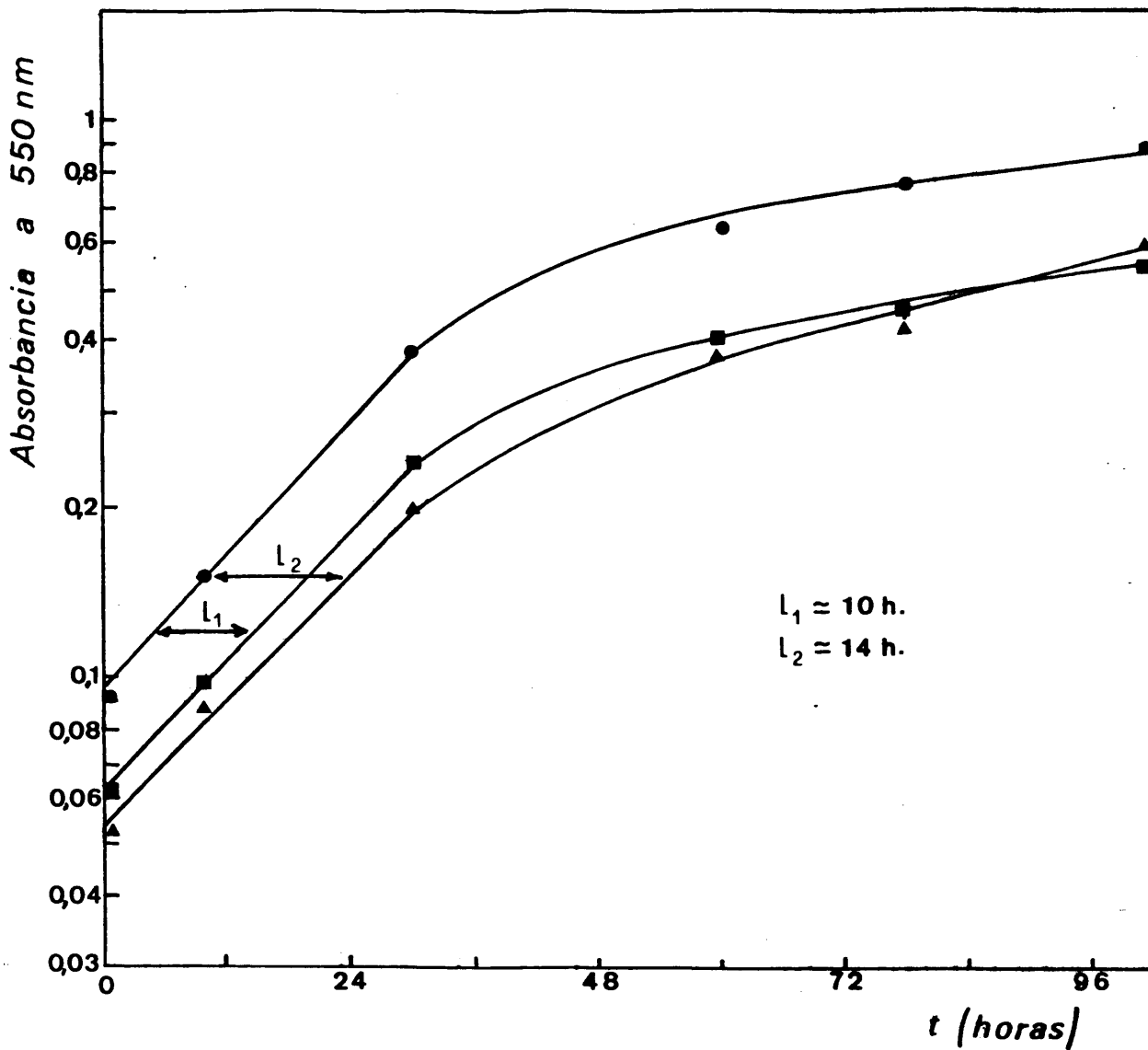


Fig. 14. Crecimiento de la cepa B-7 en presencia de picloram - - (■ 400 ppm) y 3,6-D (▲ 1000 ppm). ● Control. El pH inicial en to dos los casos se llevó a 6,8.  $l_1$  y  $l_2$  indican los periodos de la tencia respecto del control, deducidos a partir de las curvas re presentadas. El tiempo cero elegido para la representación es a- queel al que la absorbancia alcanzó un valor medible en los tres casos.

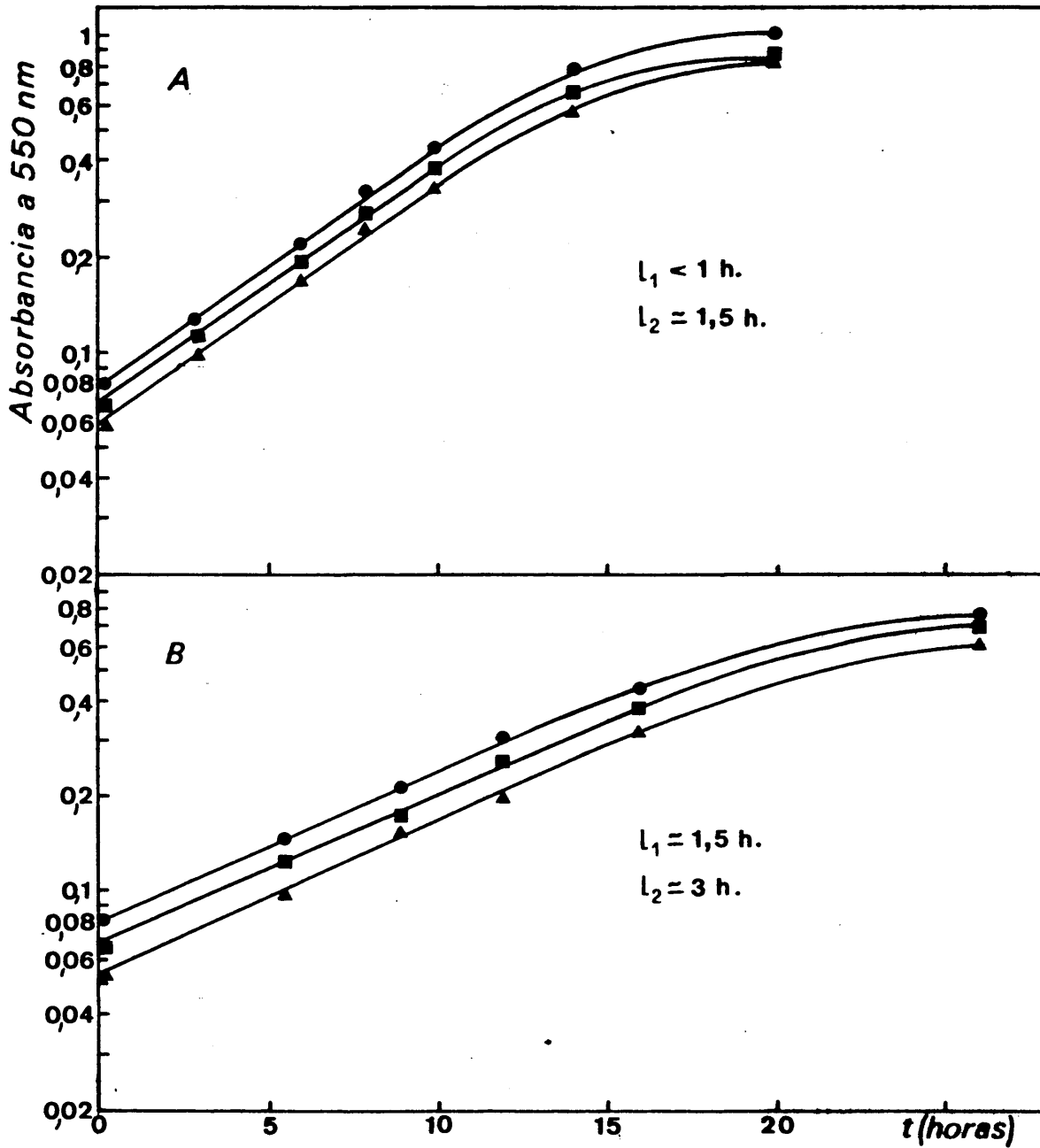


Fig. 15. Crecimiento de la cepa Tr-7 (A) y Ca-7 (B) a un pH inicial del medio de cultivo de 6,8 en presencia de picloram (■ 400 ppm) y 3,6-D (▲ 1000 ppm). ● Control.  $l_1$  y  $l_2$  son los respectivos periodos de latencia respecto del control, deducidos de las curvas representadas. El tiempo cero elegido para la representación es aquel al que la absorbancia alcanzó en los tres casos un valor medible.

Tabla 23. Retardo del crecimiento<sup>x</sup> de Rhizobium spp. en medio líquido (pH, 6,8) en presencia de herbicidas.

Herbicida y Dosis (ppm)	Cepa		
	B-7 y B-12	Ca-7	Ts-7 y Tr-3
<u>Picloram</u>			
100	4	0	0
200	8	1	<1
400	10	1,5	<1
<u>3,6-D</u>			
100	1	0	0
500	11	2	<1
1000	14	3	1,5

<sup>x</sup> horas, respecto de un control sin herbicida.

Además ambas cepas, así como la Ca-7, esta última de características fisiológicas diferentes a las de R. trifolii (tablas 19 y 20), no se vieron, aparentemente, afectadas a dosis de ensayo para cada uno de los herbicidas de alrededor de 100 ppm, a diferencia de lo observado con la cepa B-7, según las figuras 12 y 13. Otros resultados con la cepa Ca-7 se exponen en la figura 15 y tabla 23

En ningún caso, se encontró que fuera afectada la división celular en la fase de crecimiento exponencial ocurriendo un periodo de adaptación, o retardo en el inicio del crecimiento, dependiente de la dosis de cada herbicida y de la cepa. Estos perioo

dos de latencia en todos los casos resultaron ser inferiores a los tiempos de generación correspondientes.

Las siguientes figuras 16 y 17 y tabla 24 reflejan los efectos de los herbicidas en las mismas cepas anteriores cuando el medio de cultivo se llevó a pH 5,5 después de la adición del herbicida.

Tabla 24. Retardo del crecimiento<sup>⊗</sup> de Rhizobium spp. en medio líquido (pH, 5,5) en presencia de herbicidas.

Herbicida y Dosis	Cepa		
	B-7	Ca-7	Ts-7
Picloram (400)	10	3	4,5
3,6-D (1000)	19	-	-

⊗ horas respecto de un control sin herbicida.

— no mantuvieron la velocidad de crecimiento del control.

Estos ensayos aislados de crecimiento a pH 5,5 se realizaron con el principal objetivo de evaluar la implicación del pH en las diferencias en la inhibición obtenidas entre cepas, en medio sólido, cuando el herbicida era aplicado sobre discos de papel whatman (tablas 21 y 22) donde dado el carácter ácido, sobre todo del 3,6-D, el pH del medio (6,8) disminuye alrededor del disco.

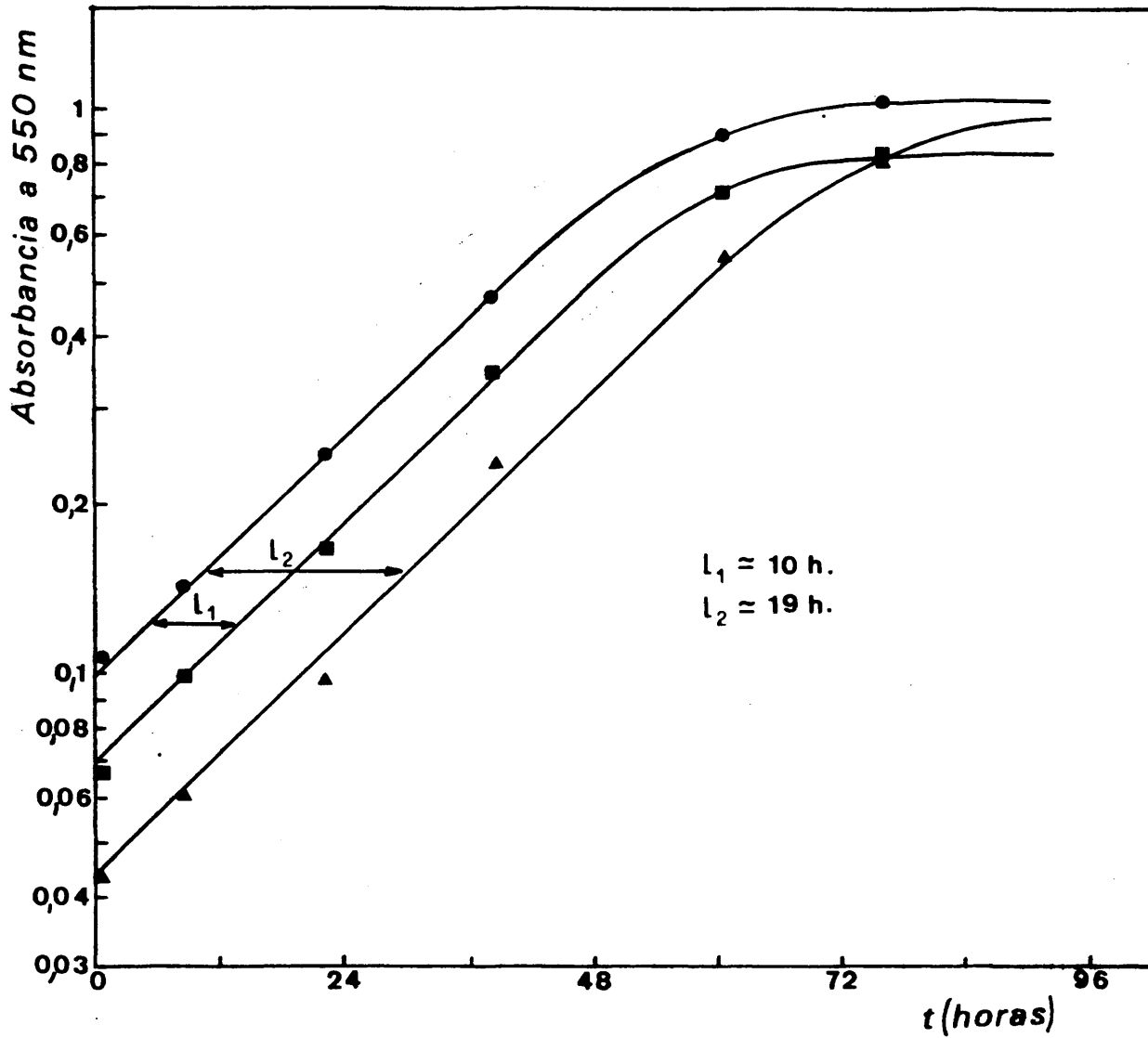


Fig. 16. Crecimiento de la cepa B-7 en presencia de picloram -- (■ 400 ppm) y 3,6-D (▲ 1000 ppm). ● Control. El pH inicial en todos los casos se llevó a 5,5.  $l_1$  y  $l_2$  indican los periodos de la tencia respecto del control, deducidos a partir de las re presentadas. El tiempo cero elegido para la representación es aquel al que la absorbancia alcanzó un valor medible en los tres casos.

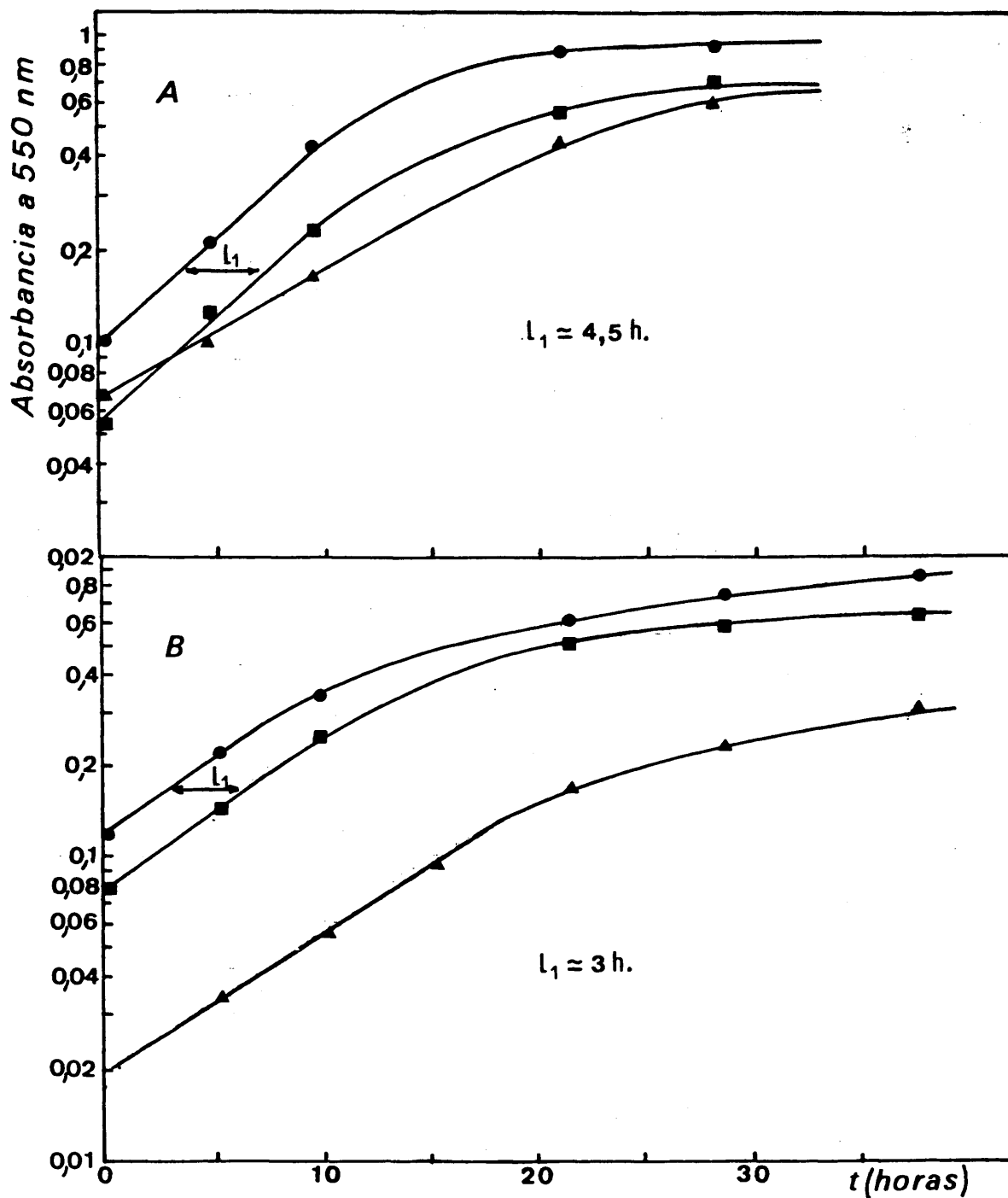


Fig. 17. Crecimiento de la cepa Tr-7 (A) y Ca-7 (B) a un pH inicial del medio de cultivo de 5,5 en presencia de picloram (■ 400 ppm) y 3,6-D (▲ 1000 ppm). ● Control.  $l_1$  es el periodo de latencia respecto del control, deducido de las curvas representadas. El periodo de latencia para 1000 ppm no pudo deducirse a partir de las curvas de crecimiento obtenidas. El tiempo cero elegido para la representación es aquel al que la absorbancia alcanzó en los tres casos un valor medible.

Se eligió el pH 5,5 para este ensayo comparativo de los efectos de los herbicidas en el crecimiento en medio ácido frente a medio neutro, ya que a este pH todas las cepas presentaron un crecimiento prácticamente igual que al pH óptimo de 6,8 y, por otra parte, las cepas B-7 y B-12 no crecieron en medio líquido a pH 4,5.

Las curvas de crecimiento a este pH ácido del medio, muestran que la respuesta para las distintas cepas y tratamientos herbicidas fue dependiente de la cepa. Así la cepa B-7, en presencia de 400 ppm de picloram ó 1000 ppm de 3,6-D, creció a igual velocidad que el control sin herbicida, pero mostrando periodos de latencia mayores a los obtenidos a pH 6,8. Se obtuvo lo mismo con las cepas Ts-7 y Ca-7 a 400 ppm de picloram (fig. 16 y 17) (comparar tablas 23 y 24 ), mientras que en presencia de 1000 ppm de 3,6-D las velocidades de crecimiento respectivas fueron menores que las del control, lo que se observa más claramente en la cepa Ts-7; así en este caso los periodos de latencia no han sido puestos en evidencia (fig. 17).

No insistiremos más sobre los efectos de los herbicidas en función del pH del medio, lo que sería objeto de amplios estudios que podrían abordarse posteriormente al trabajo de esta tesis.

En la tabla 25 se muestra la modificación del pH inicial del medio de cultivo,  $Rh_0$ , (6,8 ó 5,5) por las distintas cepas y según el tratamiento herbicida.

Tabla 25. Efecto del crecimiento<sup>✕</sup> de Rhizobium spp. en la modificación del pH inicial del medio de cultivo Rh<sub>6</sub>, en ausencia y presencia de los herbicidas.

Herbicida y dosis (ppm)	Cepa		
	B-7	Ca-7	Tr-7
<u>A pH inicial 6,8</u>			
Control	7,6	7,2	6,6
Picloram (400)	7,6	7,0	6,5
3,6-D (1000)	7,6	6,7	6,5
<u>A pH inicial 5,5</u>			
Control	7,5	6,5	6,0
Picloram (400)	7,4	6,4	5,0
3,6-D (1000)	7,5	5,7	5,4

✕ hasta la fase estacionaria

#### 3.2.4. Efecto en la viabilidad

Los ensayos de viabilidad en presencia de herbicida se plantearon con el objeto de aclarar la naturaleza del periodo de latencia observado en el crecimiento de los rizobios a partir de cierta dosis de herbicida. Para ello, fueron realizados recuentos de viables a intervalos de tiempo distintos, según la cepa, y durante un periodo no superior al tiempo de latencia obtenido para las dosis más altas de ensayo de cada herbicida. Así, de los resultados recogidos en la tabla 26., se deduce que, para todas las

Tabla 26. Efecto de la presencia de herbicida en la viabilidad<sup>1</sup> de Rhizobium spp.

Herbicida y Dosis (ppm)	Cepa					
	B-7		Ca-7		Ts-7	
	Tiempo <sup>2</sup> (horas)					
	6	12	3	6	2	4
Control	17	29	28	42	6,3	8,1
<u>Picloram</u>						
50	16	26	28	44	6,5	8,4
200	14	22	25	40	6,1	7,8
400	12	17	23	35	5,7	7,0
<u>3,6-D</u>						
100	18	27	27	40	6,2	8,4
500	16	23	24	37	6,0	7,7
1000	14	16	19	27	5,2	6,8

1) Recuento de viables en placa ( $\times 10^7$ ).

2) Tiempo de exposición al herbicida.

-- Los recuentos medios a tiempo cero fueron  $13 \times 10^7$ ,  $18 \times 10^7$  y  $4,4 \times 10^7$  células/ml para las cepas B-7, Ca-7 y Ts-7 respectivamente.

cepas, el número de viables se mantuvo prácticamente constante - durante el periodo de latencia del cultivo, como se observa claramente al comparar los recuentos, en presencia de 400 ppm de picloram y 1000 ppm de 3,6-D, con los tiempos de latencia correspondientes, dados en la tabla 24; asimismo, a dosis menores, el número de viables se vió variablemente incrementado, reflejando tiempos de latencia distintos.

### 3.2.5. Utilización de los herbicidas como fuente de carbono y energía

Ninguno de los compuestos picloram ó 3,6-D, fue útil - como fuente de carbono y energía en ninguna de las tres cepas, bajo ensayo, B-7, Ca-7, Tr-7, cuando fueron incluidos en un medio de cultivo definido, libre de fuente carbonada, y a la concentración de 100-200 ppm de herbicida. Tampoco los mismos rizobios adaptados al herbicida, es decir cultivados previamente en el medio definido completo y en presencia de herbicida, fueron capaces de utilizar ninguno de los compuestos. Así, no hubo crecimiento del cultivo líquido en ningún caso sin la presencia de fuente de carbono adicional; partiendo de una densidad óptica inicial, a 550 nm, de 0,1 sólo se obtuvo un incremento despreciable de la misma, hasta 0,13-0,15, que era alcanzado durante el primer periodo de incubación para luego permanecer constante antes de decrecer.

### 3.2.6. Efectos en el consumo de oxígeno

Los efectos de la adición de herbicida en la respiración de células no expuestas anteriormente al mismo, en condiciones de no crecimiento y con manitol como sustrato, resultaron ser semejantes en las tres cepas de Rhizobium ensayadas. Las respuestas pueden observarse en las siguientes figuras (18 a 21) y otros detalles de la experimentación en el apartado 2.2.3.4. de Material y Métodos.

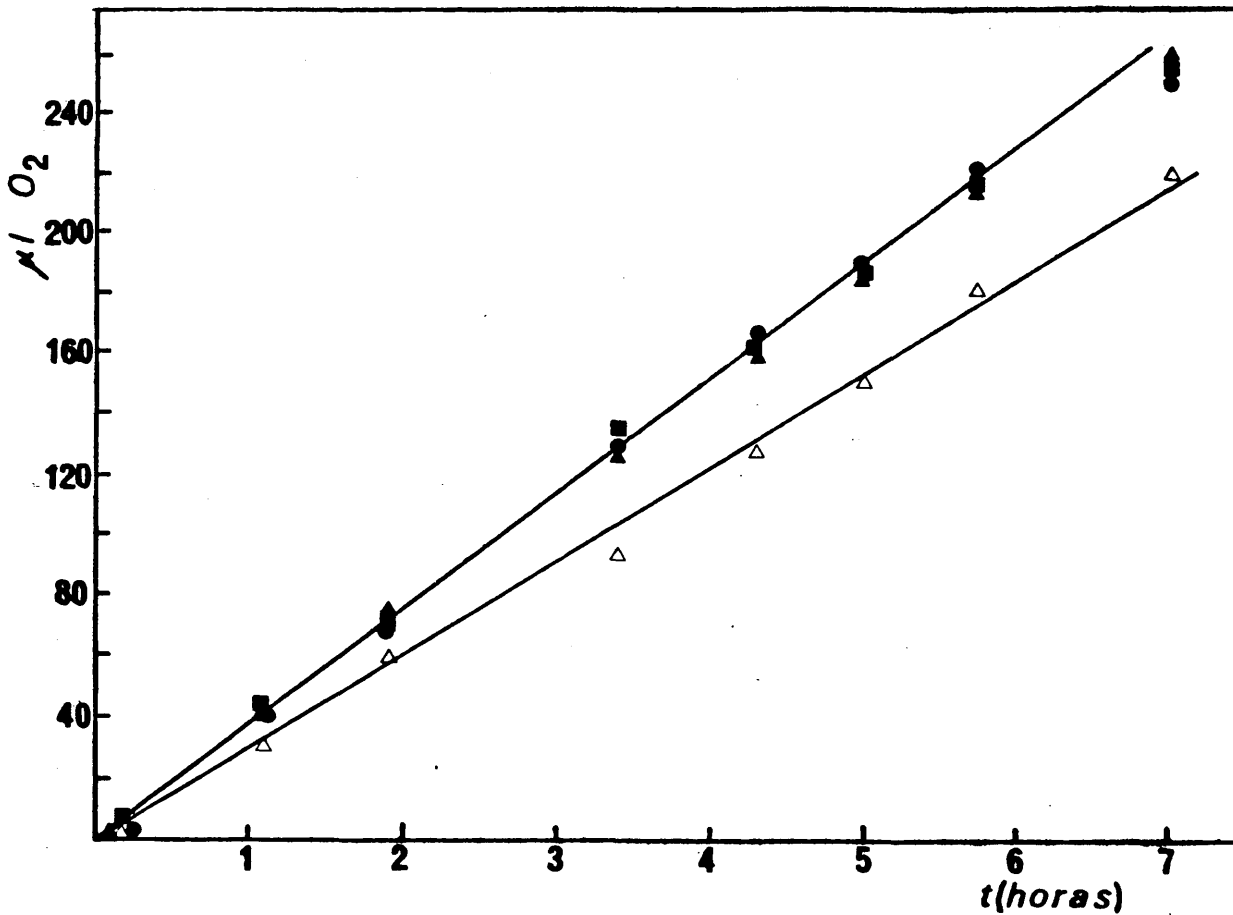


Fig. 18. Efecto de la adición de picloram en el consumo de  $O_2$  de una suspensión de células, en tampón pH 7 y manitol de la cepa B-7.  $\Delta$  Control,  $\bullet$  50,  $\blacksquare$  200,  $\blacktriangle$  300 ppm.

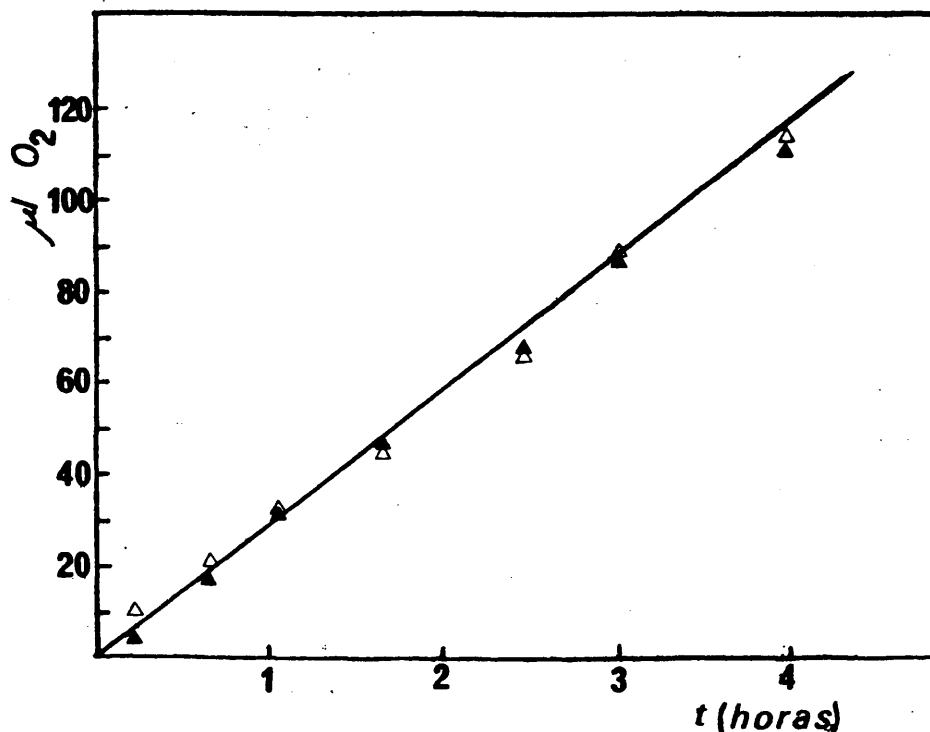


Fig. 19. Efecto de la adición de 3,6-D en el consumo de  $O_2$  de una suspensión de células, de la cepa B-7, en tampon pH 7 y manitol.  $\Delta$  Control,  $\blacktriangle$  500 ppm.

La adición de picloram produjo aumento del consumo de  $O_2$ , resultando prácticamente igual en el intervalo de dosis de ensayo (fig. 18), en todas las cepas estudiadas. El efecto fue apreciable desde el momento de la puesta en contacto de las células con el herbicida, cuando se trató de las cepas B-7 y Tr-7, (fig. 18 y 20). Sin embargo, parece observarse un periodo de latencia en la aparición de la respuesta en la cepa Ca-7 (fig. 21). Quizá las diferencias cuali y cuantitativas del mucílago extracelular producido por las distintas cepas, pudiera influir en la rapidez de la respuesta.

A diferencia con el picloram, la adición de 3,6-D no

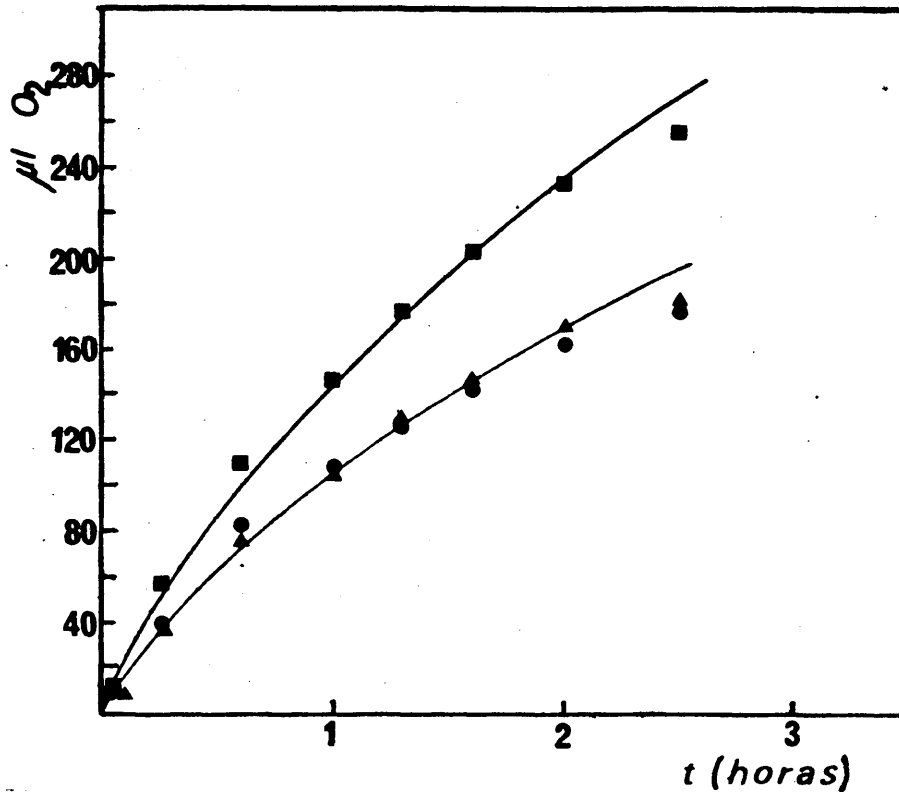


Fig. 20. Efecto de la adición de picloram (■ 300 ppm) y 3,6-D (▲ 500 ppm) en el consumo de  $O_2$  de una suspensión de células, en tampon pH 7 y manitol, de la cepa Tr-7. ● Control.

afectó el consumo de  $O_2$  a ninguna de las dosis de ensayo, 100 y 1000 ppm, (fig. 19 a 21) concentración esta última, que produjo un notorio retardo en el crecimiento en todas las cepas (tabla 23).

Por otra parte, cuando las células de Rhizobium habían sido cultivadas en presencia de herbicida, la respiración no se vio prácticamente afectada, obteniéndose el mismo grado de consumo de oxígeno, tanto si estaba presente el herbicida como en el caso de que hubiese sido eliminado. Estos ensayos se realizaron en condiciones de no crecimiento, cuyos detalles experimentales -

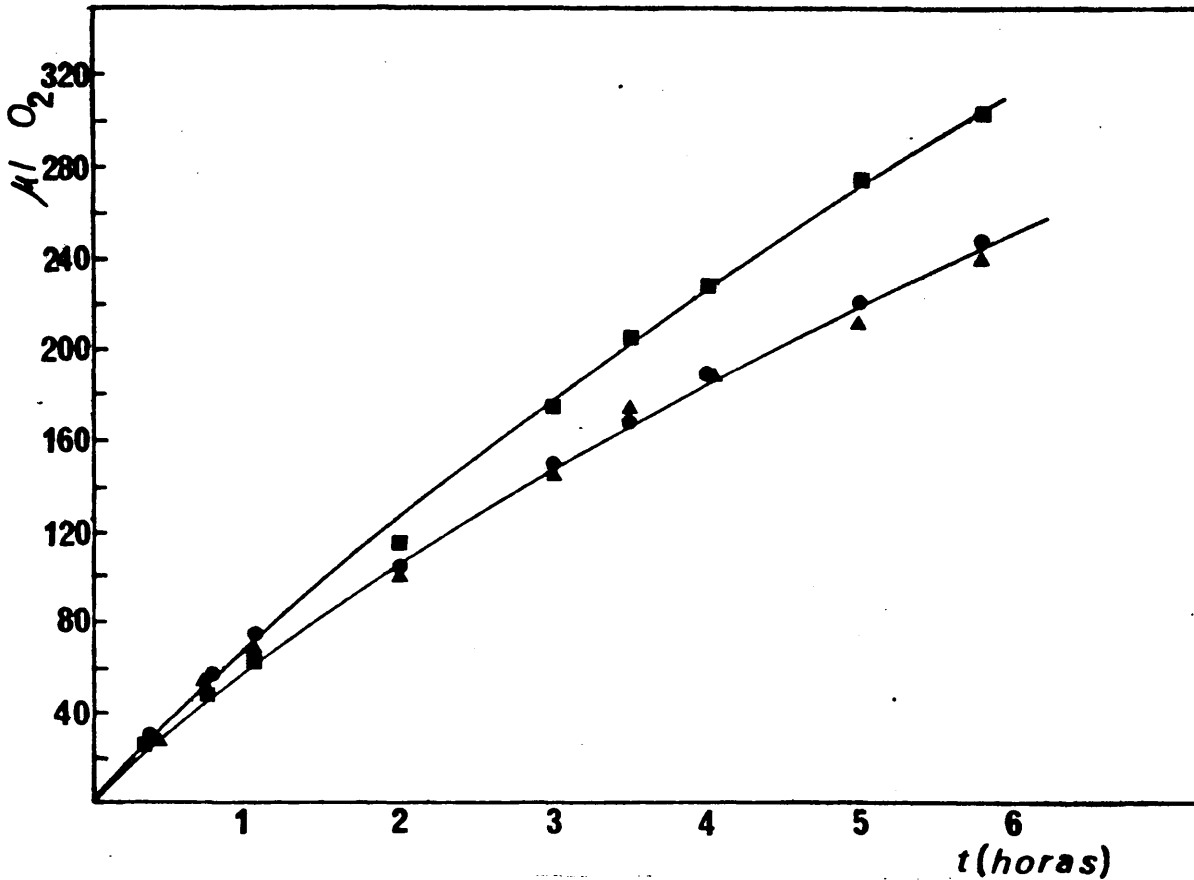


Fig. 21. Efecto de la adición de picloram (■ 300 ppm) y 3,6-D (▲ 500 ppm) en el consumo de O<sub>2</sub> de una suspensión de células, en tampon pH 7 y manitol de la cepa Ca-7. ● Control.

se expusieron en el apartado 2.2.3.4. de Material y Métodos.

La respuesta de las cepas cultivadas en presencia de picloram se muestra en la fig. 22, mientras que la de las cepas adaptadas a la presencia de 3,6-D se recogen en la fig. 23.

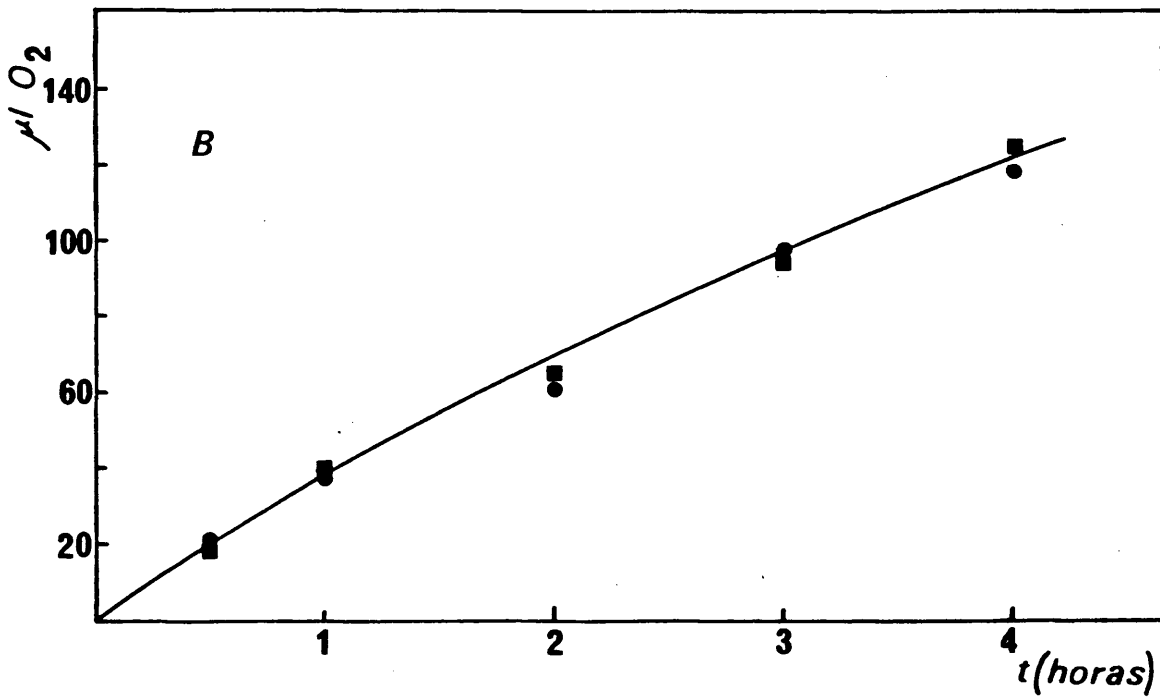
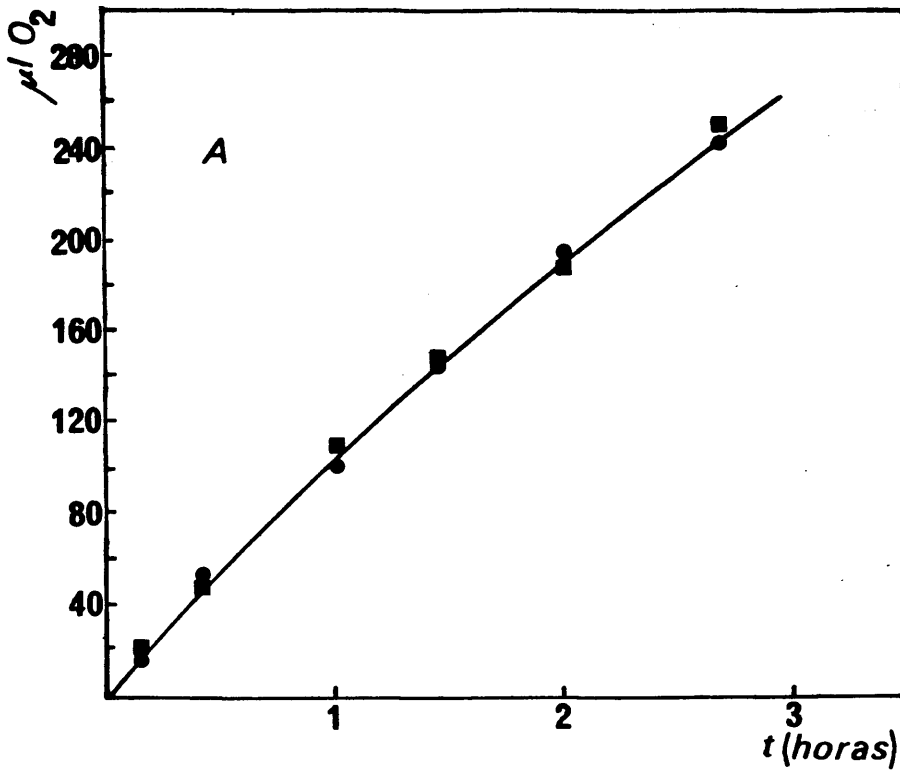


Fig. 22. Consumo de  $\text{O}_2$ , en presencia (■) y ausencia (●) de picloram (300 ppm), por células suspendidas en tampón pH 7 y manitol las cuales habían sido cultivadas en presencia de 300 ppm del herbicida. En fig. A, cepa Ts-7 y en fig. B, cepa B-7.

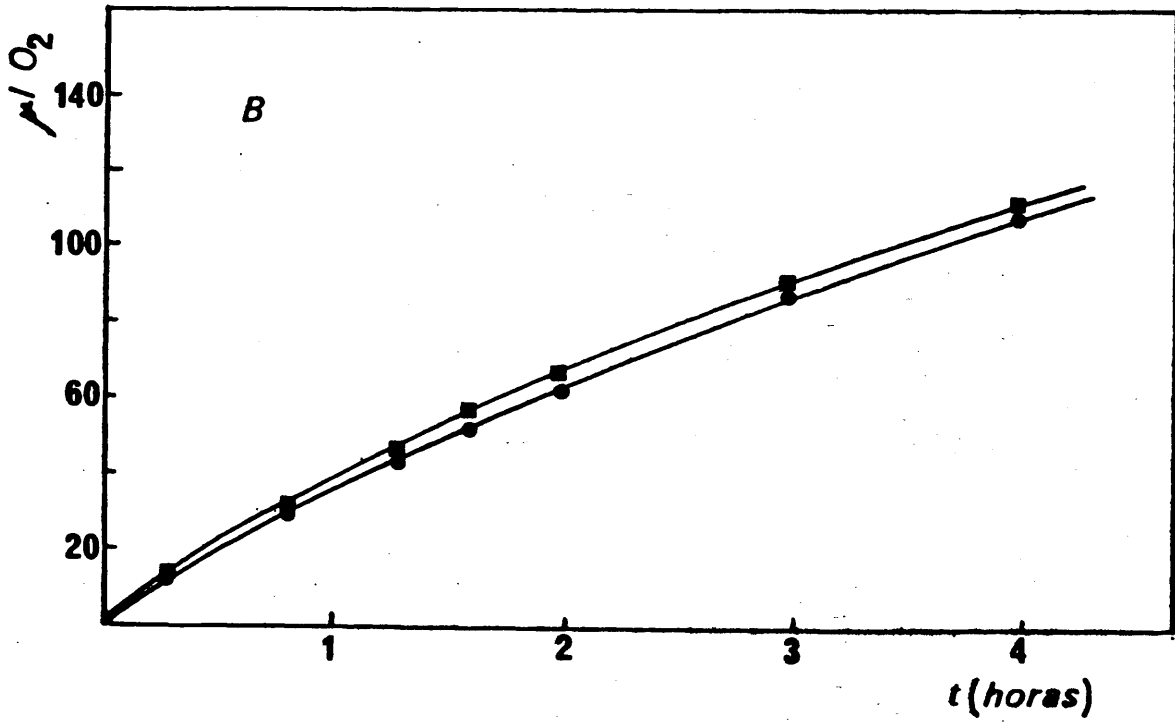
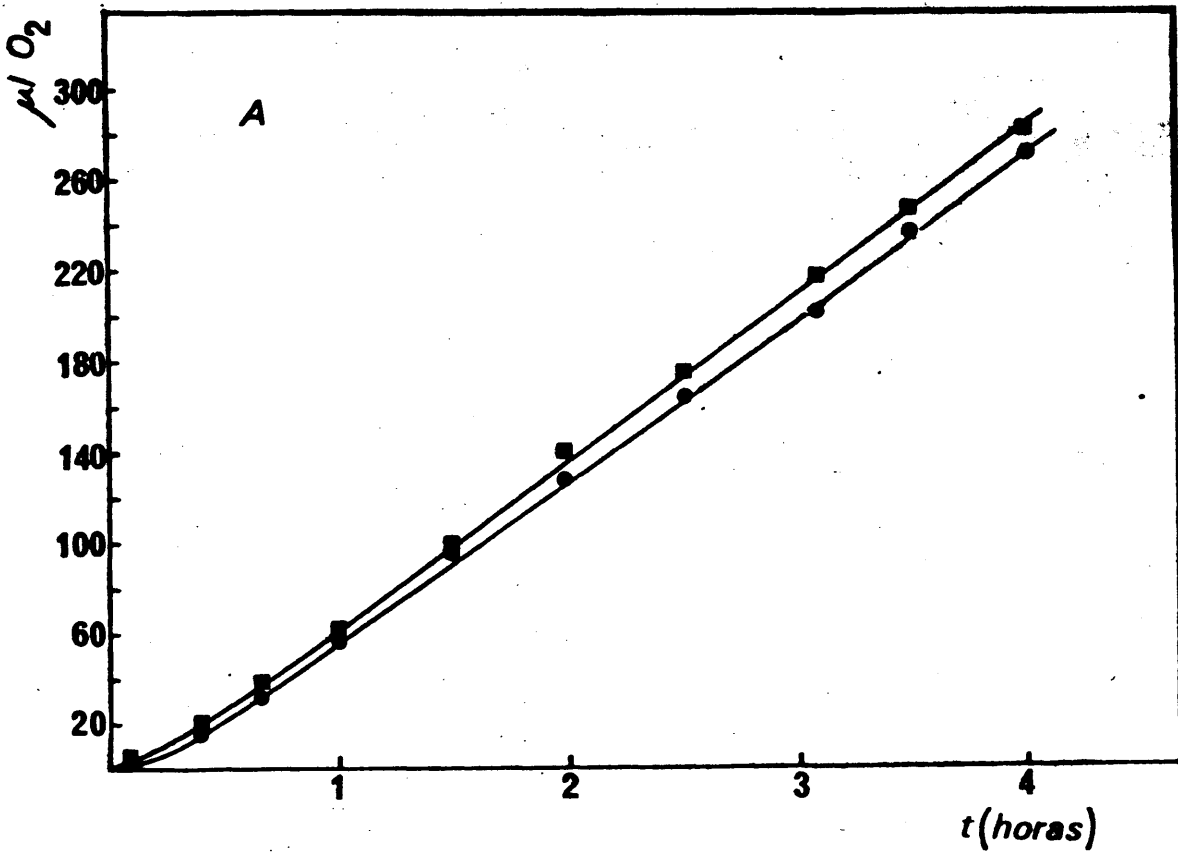


Fig. 23. Consumo de O<sub>2</sub>, en presencia (■) y ausencia (●) de 3,6-D (500 ppm), por células suspendidas en tampón pH 7 y manitol, las cuales habían sido cultivadas en presencia de 500 ppm del herbicida. En fig. A, cepa Ca-7 y en fig. B, cepa B-7.

### 3.2.7. Efectos en el contenido de RNA y proteína celular

Entre los posibles efectos de los herbicidas en el metabolismo celularo en los niveles de constituyentes celulares que pudieran ser modificados por la presencia de herbicida, nos han interesado fundamentalmente, el contenido de RNA y proteína, ya que, sobre todo el primero se ha visto aumentado o disminuido con frecuencia en plantas, dependiendo de la especie vegetal y según se trate de tejido meristemático o maduro.

De las dos concentraciones de herbicidas ensayadas, la más baja no había producido efecto aparente en el crecimiento -- (sólo en la cepa B-7 hubo un pequeño retardo); por el contrario, la dosis más alta lo había afectado en las tres cepas, según resultados anteriormente expuestos (apartado 3.2.3.).

En los resultados que se presentan en la tabla 26 se observa que los niveles de proteína en todas las cepas fueron independientes del tratamiento herbicida. Sin embargo, parece existir un ligero aumento en el contenido de RNA, a todas las dosis de picloram y 3,6-D, máximo en la cepa B-7 (13% por término medio) y poco apreciable en la cepa Ts-7, en las condiciones del ensayo.

### 3.2.8. Sensibilidad relativa a los herbicidas de mutantes, sensible y resistentes a antibióticos

Estos ensayos se han llevado a cabo con el interés de investigar la posible diversidad fisiológica dentro de la cepa -

Tabla 26. Contenido de RNA<sup>1</sup> y proteína<sup>2</sup> de células de Rhizobium spp cultivadas en presencia de herbicida.

Herbicida y Dosis (ppm)	Cepa					
	B-7	Proteína <sup>2</sup>	RNA	Proteína	RNA	Proteína
Control	15,2	0,43	47,4	0,65	40,8	0,54
<u>Picloram</u>						
50	18,0	0,45	49,5	0,69	42,3	0,53
400	19,6	0,45	50,1	0,66	42,5	0,52
<u>3,6-D</u>						
100	19,2	0,39	55,3	0,64	42,9	0,55
1000	20,8	0,40	52,7	0,62	43,6	0,53

1)  $\mu\text{g}/\text{mg}$  peso seco de células.

2)  $\text{mg}/\text{mg}$  peso seco de células.

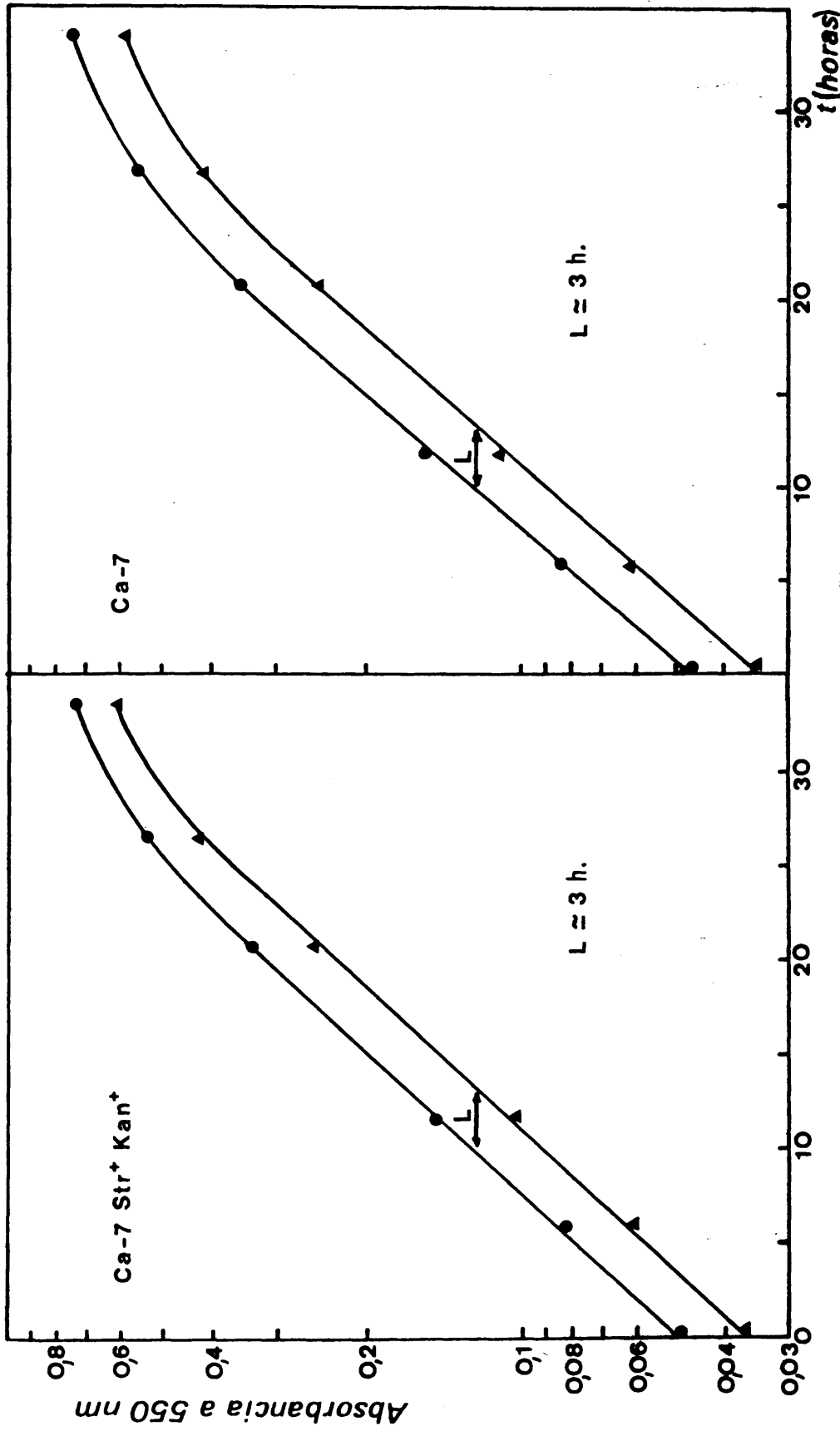


Fig. 24. Comparación del efecto de 3,6-D sobre el crecimiento de los mutantes, sensible (Ca-7) y resistente (Ca-7 Str<sup>+</sup> Kan<sup>+</sup>) a estreptomycin y kanamicina, a las concentraciones respectivas de 250 µg/ml y 200 µg/ml. ● Control, ▲ 1000 ppm de 3,6-D. l, latencia respecto del control.

salvaje en relación con la sensibilidad a los herbicidas.

Se han utilizado los siguientes mutantes: cepa Ca-7 y los dos resistentes a antibióticos, Ca-7 Strep<sup>+</sup> (resistente a 250  $\mu$ g de estreptomina/ml) y Ca-7 Strep<sup>+</sup> Kan<sup>+</sup> (resistente a 250  $\mu$ g de estreptomina + 200  $\mu$ g de kanamicina).

En la figura 24 se muestran las curvas de crecimiento del mutante sensible y del resistente Ca-7 Strep<sup>+</sup> Kan<sup>+</sup>, cuando eran cultivados en ausencia y presencia de 3,6-D (1000 ppm), habiéndose obtenido semejantes resultados con el otro mutante resistente. Con el picloram (400 ppm) se obtuvo, esencialmente, el mismo resultado. Las velocidades de crecimientos de los tres mutantes fueron muy semejantes entre sí y se mantuvieron en presencia de los herbicidas; asimismo, los periodos de latencia correspondientes al picloram y 3,6-D, a las dosis de ensayo, fueron independientes del mutante, como se observa en la citada figura elegida como representativa.

### 3.2.9. Efectos en relación con la resistencia a antibióticos

Todas las cepas de Rhizobium ensayadas presentaron la misma sensibilidad frente a distintas dosis de estreptomina y kanamicina, tanto si habían sido cultivadas en ausencia como en presencia de picloram (400 ppm) ó 3,6-D (1000 ppm), como muestran los resultados de la tabla 27. No sólo el halo de inhibición del crecimiento fue semejante en todos los casos, sino que dentro de los mismos no se observaron diferencias significativas en la apa-

Tabla 27. Resistencia a antibióticos de Rhizobium spp. según el pretratamiento herbicida aplicado, a pH 6,8.

Cepa	Preincubación en herbicida	Estreptomicina (dosis)**			Kanamicina (dosis)**		
		1000	500	100	1500	500	100
Tr-7	Control	1,2	0,9	0,4	1,0	0,7	0,4
	Picloram	1,1	0,9	0,4	1,4	0,8	0,5
	3,6-D	1,1	0,8	0,4	1,1	0,7	0,3
Ca-7	Control	1,6	1,0	0,1	1,2	1,0	0,7
	Picloram	1,5	0,8	0,1	1,1	1,0	0,7
	3,6-D	1,5	0,8	0,1	1,2	1,0	0,6
		250	100	50	250	100	50
B-7	Control	0,9	0,4	0,1	1,2	0,5	0,1
	Picloram	0,9	0,4	0,1	1,1	0,6	0,1
	3,6-D	1,0	0,3	0,1	1,2	0,5	0,1

\* Halo de inhibición en cm.

\*\* µg/disco.

1) 400 ppm de picloram. 2) 1000 ppm de 3,6-D.

rición de colonias resistentes a los antibióticos con el tratamiento herbicida al que fueron sometidos los rizobios.

### 3.2.10. Efectos en la simbiosis Rhizobium-leguminosa

Nos han interesado las consecuencias de la acción del herbicida en los rizobios -cuando son cultivados en su presencia- en la fijación de  $N_2$  en simbiosis con la leguminosa. La actividad nitrogenasa de los nódulos ha sido aquí considerada como el principal parámetro para estimar la eficiencia en la fijación de  $N_2$ .

Según el sistema Rhizobium-leguminosa de que se trate, la actividad nitrogenasa de los nódulos (con acetileno como sustrato), dependiendo de las condiciones de ensayo, presenta un intervalo de tiempo, más o menos amplio, en el que se obtiene una relación lineal. La relación actividad nitrogenasa-tiempo, para los distintos sistemas Rhizobium-leguminosa, se representa en la figura 25. Sólomente en el caso de los nódulos de Cicer arietinum parece existir un corto periodo de latencia necesario, quizás, para la penetración del acetileno al interior de los mismos. En los otros casos, la reducción de acetileno comenzó, aparentemente, de inmediato. Ante las relaciones observadas, las determinaciones de la actividad nitrogenasa para los distintos tratamientos herbicidas, fueron obtenidas después de una hora de exposición de los nódulos al acetileno; y ya que, en todos los casos la actividad fue constante al menos durante dos horas, existe un suficiente margen de seguridad en el tiempo elegido para la toma de muestras.

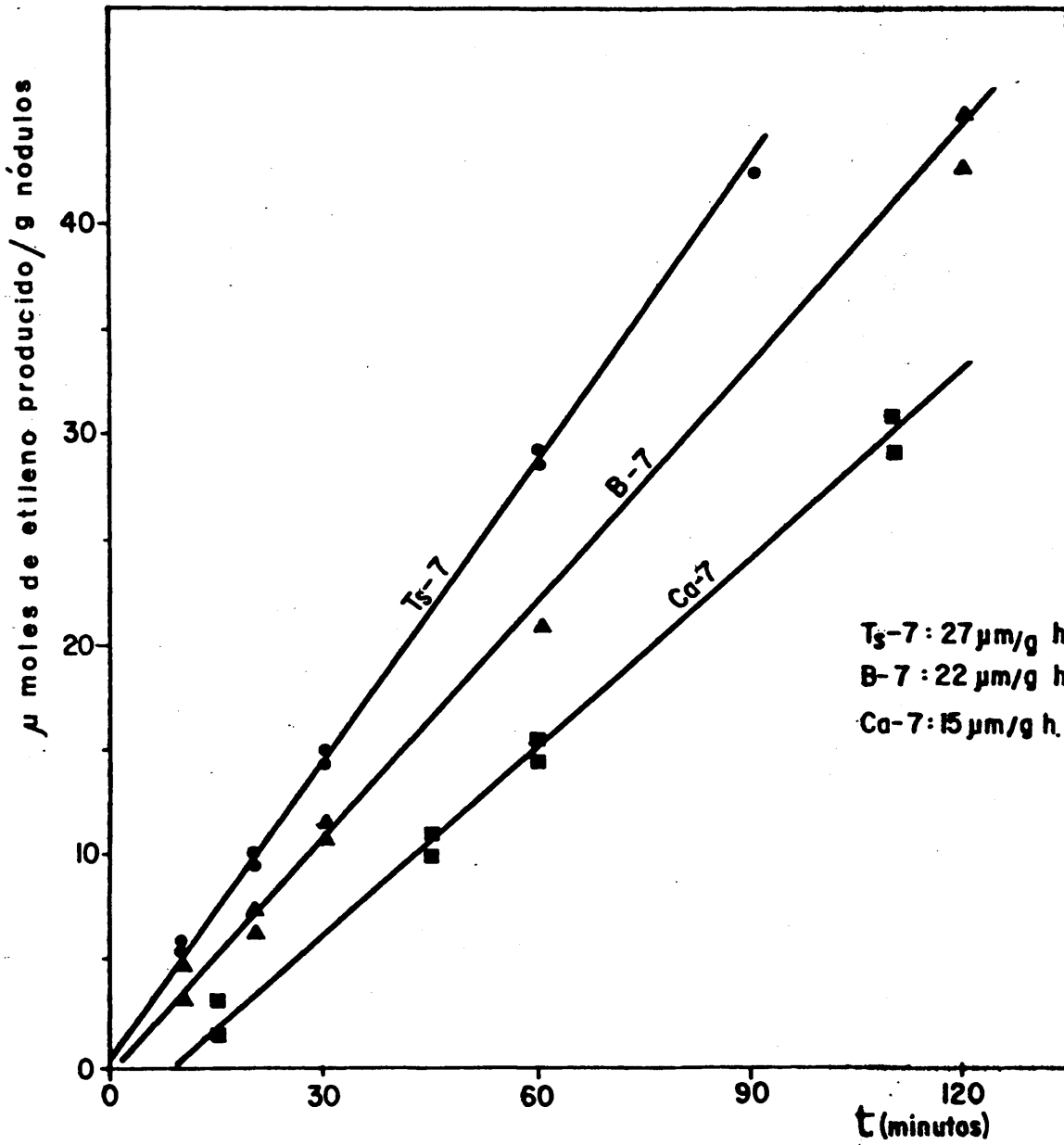


Fig. 25. Actividad nitrogenasa de nódulos producidos por las cepas Ts-7, B-7 y Ca-7 en Trifolium subterraneum, Lotus pedunculatus y Cicer arietinum respectivamente. A tiempo cero segmentos de raíz con nódulos fueron puestos en contacto con acetileno al 10% en aire.

Tabla 27. Valores de parámetros relacionados con la infectividad y fijación de N<sub>2</sub> de la cepa Ca-7 de Rhizobium, en simbiosis con Cicer arietinum, según el pretratamiento herbicida al que fue so metida.

Herbicida y Dosis (ppm)	Etileno produci <sup>x</sup> do por nódulos ( $\mu$ g/h. g peso fresco nod.)	Nº nódulos por planta	Peso fres co nódulos por planta (g)	Peso seco parte ae- rea por planta (g)
<u>Picloram</u>				
0	13,3 $\pm$ 2,1	35,0	0,23	1,02
50	12,8 $\pm$ 0,9	40,3	0,27	0,99
200	12,7 $\pm$ 2,5	47,0	0,28	0,98
400	14,5 $\pm$ 2,1	52,6	0,32	1,01
<u>3,6-D</u>				
0	12,6 $\pm$ 2,6	31,6	0,19	0,99
100	12,3 $\pm$ 2,8	49,3	0,28	1,05
500	12,8 $\pm$ 2,5	47,0	0,30	0,98
1000	12,9 $\pm$ 1,6	39,3	0,19	0,97

x Los valores son la media  $\pm$  el error estandar de un mínimo de seis determinaciones.

- El resto de los datos son la media de tres valores, cada uno obtenido de cuatro plantas del mismo tiesto.

Los efectos producidos por los herbicidas en Rhizobium spp., en cuanto a su capacidad de infección y eficiencia en la fijación de N<sub>2</sub>, se reflejan en los distintos parámetros incluí-

Tabla 28. Valores de parámetros relacionados con la infectividad y fijación de N<sub>2</sub> de la cepa Ts-7 de Rhizobium, en simbiosis con Trifolium subterraneum, según el pretratamiento herbicida al que fue sometida.

Herbicida y Dosis (ppm)	Etileno producido por nódulos ( $\mu$ g/h. g peso fresco nod.)	Nº nódulos por planta	Peso fresco nódulos por planta (g)	Peso seco parte aérea por planta (g)
<u>Picloram</u>				
0	28,5 $\pm$ 4,5	57,6	0,11	0,86
50	16,1 $\pm$ 4,3	64,3	0,12	0,74
400	14,0 $\pm$ 2,1	31,3	0,09	0,65
<u>3,6-D</u>				
0	27,6 $\pm$ 2,4	51,6	0,10	0,82
100	22,8 $\pm$ 4,6	66,3	0,13	0,79
1000	22,9 $\pm$ 6,8	60,0	0,12	0,76

\* Los valores son la media  $\pm$  el error estandar de un mínimo de seis determinaciones.

- El resto de los datos son la media de tres valores, cada uno obtenido de seis plantas del mismo tiesto.

dos en las tablas 27, 28 y 29, las cuales recogen, respectivamente los resultados obtenidos para los diferentes sistemas Rhizobium-leguminosa ensayados. Los resultados expuestos en las tablas 27 y 28 fueron obtenidos a partir de plantas correspondientes a dos experiencias, o repeticiones por dosis de herbicida, siendo los -

Tabla 29. Valores de parámetros relacionados con la infectividad y fijación de N<sub>2</sub> de la cepa B-7 de Rhizobium, en simbiosis con Lotus pedunculatus, según el pretratamiento herbicida al que fue sometida.

Herbicida y Dosis (ppm)	Etileno producido por nódulos ( $\mu$ g/h. g peso fresco nod.)	Nº nódulos por planta	Peso fresco nódulos por planta (g)	Peso seco de la planta (g)
Control	22,4 $\pm$ 7,1	23,3	0,014	0,023
<u>Picloram</u>				
50	23,1 $\pm$ 5,6	26,3	0,014	0,023
200	15,8 $\pm$ 5,2	23,0	0,009	0,020
400	11,4 $\pm$ 6,3	19,0	0,008	0,019
<u>3,6-D</u>				
100	17,6 $\pm$ 6,5	25,3	0,015	0,020
500	9,5 $\pm$ 3,2	26,6	0,011	0,017
1000	7,9 $\pm$ 4,5	20,6	0,004	0,010

× Los valores son la media  $\pm$  el error estandar de un mínimo de cuatro determinaciones.

- Asimismo, el resto de los datos son la media de los valores obtenidos con un mínimo de cuatro plantas.

inóculos en cada experiencia procedentes de dos cultivos distintos del mismo Rhizobium. Los valores correspondientes a Lotus sp. recogidos en la tabla 29, fueron obtenidos a partir de seis plantas por tratamiento herbicida, inoculadas cada dos con células -

procedentes de un mismo cultivo de Rhizobium.

La actividad nitrogenasa de los nódulos de Cicer sp. - no se vió afectada a ninguno de los distintos pretratamientos - herbicidas aplicados al Rhizobium. Por otra parte, se obtuvo efecto positivo en la nodulación; así, tanto el número de nódulos por planta como el peso fresco de los mismos fueron ligeramente incrementados. Sin embargo, los nódulos de trébol presentaron actividad nitrogenasa inferior a la obtenida para el control, con ligeras diferencias en el caso del 3,6-D y más apreciables en el caso del picloram. Paralelamente el peso seco de la parte aérea de la planta disminuyó, no ocurriendo lo mismo en cuanto a la nodulación, excepto en el caso de los rizobios cultivados en presencia de 400 ppm de picloram en el que se presentó reducción. También hubo desminución de la actividad nitrogenasa en nódulos de Lotus sp. para ciertas dosis de picloram y 3,6-D con ligero efecto sobre el desarrollo de la planta, coincidente con las actividades fijadoras de N<sub>2</sub> más bajas. Parece observarse cierta reducción de la nodulación a las dosis más altas para los dos herbicidas bajo ensayo, más que en el número, en el tamaño de los nódulos.

#### 4. DISCUSION

##### 4.1. Efectos de picloram y 3,6-D en la nitrificación

Los efectos de compuestos químicos sobre el proceso de Nitrificación, además de por su importancia en el suelo, han sido frecuentemente abordados ante la consideración de tal proceso como indicador del posible efecto ejercido sobre el equilibrio de la microflora que sustenta el mismo, como sugieren diversos autores (Alexander, 1965b; Domsch y Paul, 1974). Nuestros resultados muy bien podrían estar en apoyo de tal consideración como se discutirá más adelante.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre Nitrosomonas europaea y Nitrobacter agilis en cultivo puro, revelan efectos en especies de autotrofos nitrificantes de distribución muy común en la mayoría de los suelos. Además existe una gran similitud fisiológica entre las distintas especies de los nitrificantes autotrofos que es, en parte, la razón de la reconocida sensibilidad de los mismos a la influencia del habitat. Por todo ello, en este caso, los resultados obtenidos en cultivo puro serían de especial valor indicativo del efecto potencial de los herbicidas estudiados sobre el proceso de nitrificación en el suelo aunque, por otra parte, la extrapolación a las condiciones en que se hallan las bacterias en el mismo sería, en el caso de los nitrificantes autotrofos, especialmente objetable, pudiendose esperar que en suelo, por las interacciones con la compleja microflora que éste sustenta y las condiciones físico- --

- químicas particulares, la cinética e incluso, posiblemente, el mecanismo de nitrificación difieran considerablemente. Así efectos primarios ejercidos por compuestos químicos sobre otra microflora, distinta que la autotrofa nitrificante, podrían indirectamente tener consecuencias decisivas sobre el proceso de nitrificación.

Los datos obtenidos de cultivos puros nos brindan, sobre todo, un complemento necesario para una mejor interpretación de muchos de los resultados obtenidos en suelo y la elección de la experimentación en suelo "in vitro" frente a la experimentación "in situ", una forma útil para poder controlar, en cierta medida, una serie de factores ambientales externos de considerable influencia en el proceso de nitrificación.

#### 4.1.1. Efectos sobre nitrificantes en cultivo puro

Tanto el picloram como el 3,6 D, compuestos muy semejantes en su estructura química, resultaron inocuos en las cepas de N.europaea y N.agilis bajo ensayo cuando fueron incorporados al medio de cultivo como productos puros y a dosis hasta los respectivos límites de solubilidad en agua, dosis en general, muy superiores a las utilizadas en la práctica agrícola.

A pesar de la pretendida inocuidad sobre los seres vivos del resto de los componentes químicos, distintos del producto activo, incluidos en las formulaciones herbicidas, con frecuencia, éstas exhiben toxicidad cuando se trata de nitrificantes autotro-

fos. Entre el escaso número de trabajos que abordan el estudio sobre autotrofos nitrificantes en cultivo puro, algunos incluyen a la vez ensayos del producto puro y las formulaciones comerciales. Caseley y Luckwill (1965) obtuvieron para la mayoría de los herbicidas derivados de urea y triazinas probadas, una nula o baja toxicidad del compuesto puro, mientras la inhibición fue notable por parte de los productos formulados. Al mismo tiempo, los heterotrofos ensayados no fueron sensibles a las mismas formulaciones. Ratnayake y Audus (1978) también refieren inhibición de nitrificantes por formulaciones que no son atribuibles al compuesto activo. En nuestro trabajo así ocurrió con picloram y su formulación Tordon 22K, resultando la última tóxica tanto para N.europaea como N.agilis, mientras que el picloram puro no fue tóxico (tabla 15). Sin embargo, los resultados obtenidos con Lontrel 300 (formulación del 3,6-D) revelaron, la inocuidad de la sal de monoetanolamina del 3,6-D además de la del resto de los componentes de esta formulación.

A pesar de la diferencia de actividades, sobre todo de N.europaea, en los distintos medios y condiciones de cultivo bajo ensayo (fig. 10 y 11) el efecto del picloram y 3,6-D sobre los dos nitrificantes ensayados fue independiente de los mismos, observándose solo en algunos casos ligeras diferencias en el tiempo de adaptación. Así, ni las diferentes concentraciones de cationes como  $Fe^{3+}$  y  $Mg^{2+}$  en los distintos medios, ni su diferente capacidad tampón (apen. 1.1 a 1.5) parecen influir en el efecto de los herbicidas sobre estos autotrofos. En algunos casos la adición de herbicida supuso una notable diferencia en el pH final del medio de cultivo, pero la prolongación del periodo de latencia no parece estar relacionada con estas variaciones del pH (comparar tabla 17 y 18).

#### 4.1.2. Efectos sobre la nitrificación de suelo

La cinética de la actividad nitrificante del suelo utilizado en este estudio, en condiciones de percolación y suplemento de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  ( $\text{N-NH}_4=100 \mu\text{g/ml}$ ), tanto en ausencia como en presencia de las distintas dosis de los herbicidas objeto de ensayo, se ajustó a curvas representativas de un crecimiento exponencial típicamente bacteriano, por lo que se consideran las actividades obtenidas en todos los casos, fundamentalmente, debidas a nitrificación autotrofa mas que a la actividad de hongos y actinomicetos, microorganismos a los que se atribuye, en gran parte, la nitrificación heterotrofa. El análisis estadístico de las ecuaciones resultantes del ajuste exponencial de los valores experimentales, recogido en las tablas 5 y 10, muestra la bondad de dichos ajustes, reflejada en sus coeficientes de variación.

En nuestros ensayos de percolación de suelo ciertas dosis de picloram (las intermedias entre las ensayados) produjeron considerable alteración aunque transitoria de la nitrificación (figuras 2 a 5). Apuntaremos, además, que los niveles de nitratos acumulados en la solución percoladora, en función del tiempo y correspondientes a la actividad nitrificante en presencia de 50 y 200 ppm fueron los que presentaron peores ajustes a las ecuaciones de crecimiento exponencial (coeficientes de variación mayores), según tabla 5.

Debemos considerar para la interpretación de estos resultados, la baja o nula toxicidad del producto puro, picloram,

antes citada sobre los microorganismos nitrificantes en cultivo puro, frente al efecto tóxico de su formulación, forma en que fue aplicado en estos ensayos de percolación. Sin embargo esta posible toxicidad del producto formulado no parece explicar las alteraciones de la nitrificación en el suelo, observadas en el intervalo de dosis 50 - 200 ppm de picloram en el sistema de suelo en percolación, ya que la intensidad del efecto en este intervalo de concentraciones resultó inversa a la dosis, siendo casi anulado a 400 ppm (tabla 6).

Los constituyentes, aparte del producto activo, de las formulaciones herbicidas suelen ser compuestos químicos muy lábiles a la acción de los microorganismos, por lo que, en general el suelo ejerce una acción protectora de los mismos frente al componente o componentes tóxicos de las formulaciones, debido a una degradación biológica, o a veces a la implicación de otros procesos. Esta posibilidad parece más probable que una posible selectividad de efecto del tóxico sobre las bacterias nitrificantes distinto, para las cepas ensayadas que para la población nativa del suelo bajo estudio.

Estas alteraciones de la nitrificación podrían ser discutidas en términos ecológicos.

Los nitrificantes autotrofos muestran gran sensibilidad a las alteraciones de su habitat, aunque se desconoce aún casi todo sobre las influencias del microambiente, sobre todo, cambios en la composición del resto de la microflora (Balickay Sobieszanski

1969; McLaren y Ardakani, 1972). Actualmente son de gran interés los estudios del comportamiento de las bacterias autotrofas nitrificantes cuando se hallan en el suelo en un microambiente ecológico particular (McLaren, 1971); se han formulado hipótesis como la posible simbiosis autotrofos-heterotrofos ante el frecuente efecto inhibitorio de muchos compuestos sobre los nitrificantes en cultivo puro, que no es encontrado en la actividad nitrificante en suelo (Lees y Quastel, 1946; Alexander, 1965b). También han sido, a menudo, observadas diferencias de comportamiento según se trate de suelo estructuralmente alterado o no (Torstensson, 1974, Grossbard, 1976). Así la acumulación de nitritos, en estos suelos parece ocurrir a concentraciones relativamente bajas, respecto a cuando son aplicados a suelos no alterados, explicándose en este sentido muchas de las diferencias de sensibilidad a un tóxico encontradas en distintos trabajos.

La estimulación de heterotrofos a ciertas dosis de picloram podría ser causa indirecta de la inhibición temporal de la nitrificación obtenida a las citadas dosis del herbicida. Los microorganismos se presentan en el suelo, a menudo, en condiciones de ayuno nutricional. El efecto de posibles fuentes de energía adicional, tales como herbicidas, o los constituyentes de su formulación, a dosis no tóxicas, pueden causar variaciones temporales de la actividad de la microflora del suelo o del metabolismo y patrones de crecimiento de ciertos microorganismos (Gray, 1970). En muchos casos la alteración del equilibrio ecológico del suelo por herbicidas es transitoria y de pequeña significancia escapando así a la detección (Goring, 1970).

En el caso del picloram hay evidencias suficientes de alteración en la microflora del suelo. Así la misma formulación que la empleada en nuestros ensayos, Tordon 22K, aplicada a suelos incubados bajo condiciones controladas de laboratorio, produjo aumento del consumo de  $O_2$  a 100 y 300 ppm, mientras que se obtuvo estímulo de la respiración a dosis mas bajas, como 10 y 30 ppm. Paralelamente el desprendimiento de  $CO_2$  no se vió afectado a ninguna de las concentraciones (Grover, 1972). Whitworth y col (1965) habían referido anteriormente estimulación del consumo de  $O_2$  a 24 y 48 Kg/Ha de picloram, lo mismo que van Schreven y col. (1970) a 5 Kg/Ha, mientras que dosis superiores e inferiores a la anterior no resultaron estimulantes. A la vez ha sido referida estimulación de grupos microbianos heterotróficos determinados, con la aplicación de picloram a dosis próximas a las de uso agrícola, en experiencias realizadas en suelo "in situ", como por ejemplo, bacterias amonificantes (Tu y Bollen, 1969; Gogvadze y col., 1972), y de la población de hongos (Gogvadze y col., 1972; Bezuglov y col., 1973). - Un efecto indirecto de la aplicación de picloram sobre la flora nitrificante autotrofa podría ocurrir a causa de la estimulación de la flora heterotrofa, ya sea por su posible antagonismo o por crear en el suelo condiciones microecológicas, transitorias o no, desfavorables a la flora nitrificante, bajo ciertas dosis de tratamiento. Así, pueden existir microambientes anaeróbicos incluso, en suelos bien aireados si la demanda biológica de oxígeno excede la velocidad de difusión de este elemento en el suelo (Alexander, 1977). Igualmente en cuanto a pH se pueden dar diferencias microambientales subyacentes a las determinaciones de pH de las mues-

tras de suelo, variaciones, por otra parte, de gran importancia ante la sensibilidad de la actividad de los nitrificantes autotrofos a variaciones de pH, incluso no muy pronunciadas. Domsch y Paul (1974) comparando los valores experimentales obtenidos en sistemas de suelo en percolación con curvas correspondientes a modelos teóricos de inhibición, encontraron en algunos casos una clara relación entre inhibición y variación del pH con el tiempo.

En cuanto a la posibilidad de que la acumulación anómala de nitritos con picloram, sobre todo a 50 ppm, (figura 5) pudiera contribuir la estimulación de heterotrofos nitrificantes oxidantes de  $\text{NH}_4^+$ , no tenemos datos experimentales, lo cual podría ser objeto de posteriores estudios. Los actinomicetos y bacterias heterotróficas nitrificantes parecen producir preferentemente nitrito como producto final de la nitrificación (Doxtader y Alexander, 1966; Verstraete y Alexander, 1972; Witzel y Overbeck 1979), mientras los hongos producirían además de nitrito, nitrato a partir de amonio (Marshall y Alexander, 1962). Aunque la capacidad nitrificante de los heterotrofos es baja comparada con la de las bacterias autotrofas nitrificantes (Gode y Overbeck, 1972; Focht y Verstraete, 1977) esto podría ser compensado por su densidad de población en el suelo.

Por otra parte, considerando solo la actividad nitrificante autotrofa, la acumulación de nitritos supone mayor sensibilidad por parte de la flora nitrificante del suelo que de la nitrificante al presentar la primera una más prolongada fase de latencia.

Las inhibiciones observadas en la nitrificación en presencia de picloram, fueron en todos los casos transitorias y nunca se obtuvieron velocidades máximas de nitrificación muy diferentes a las del control sin herbicida. En presencia de 400 ppm la velocidad máxima fue incluso superior, al mismo tiempo que la cinética de la nitrificación resultó semejante a la del control. Todo ello apoyaría el escaso efecto directo del herbicida, y formulación herbicida, sobre los nitrificantes autotrofos del suelo en percolación. A la vez, la actividad de Nitrobacter agilis, a esta dosis de picloram, resultó ligeramente estimulada después de un cierto periodo de adaptación. La flora heterotrofa antagonista podría resultar, a la más alta dosis de picloram de las ensayadas, bien inhibida, o al menos no estimulada por el herbicida. Así, Ratnayake y Audus (1978), al comparar los parámetros de crecimiento obtenidos para cultivos puros de nitrificantes autotrofos con los de la nitrificación de suelo en percolación, no encontraron relación, sobre todo, en cuanto a los efectos observados en los oxidantes de  $\text{NH}_4^+$ ; además la estimulación obtenida en suelo, por efecto de algunos herbicidas, tampoco ocurrió en los organismos nitrificantes en cultivo puro, sugiriendo estos autores que podría ser debida a la inhibición de microorganismos antagonistas de los nitrificantes. Por otra parte, los nitrificantes multiplican su número hasta lo que permite la capacidad de soporte por parte de la superficie de las partículas de suelo y, al menos que éste haya sido previamente esterilizado y luego inoculado con nitrificantes, otros organismos podrían ocupar también parte de la superficie intrínseca del suelo útil al crecimiento de los nitrificantes (Mclaren y Ardakani, 1972),

compitiendo, así, por el nicho ecológico.

En el trabajo de Debona y Audus (1970), utilizando técnicas de percolación en ensayos con una amplia variedad de herbicidas se refiere, que las velocidades máximas de formación de nitratos en presencia de clortiamid no resultaron proporcionales a la dosis de herbicida. Así a 50 ppm disminuyó considerablemente este parámetro respecto del control; mientras que a una dosis doble fue mayor, aunque fue, a la vez, retardado el inicio de la nitrificación. Además, las velocidades de nitrificación, en ausencia de herbicida y en presencia de 100 ppm, fueron similares en suelo previamente enriquecido en nitrificantes, mientras a 50 ppm fue significativamente reducida. Casos semejantes, con mayor intensidad de efecto a dosis intermedias de ensayo, fueron referidos por Vlassak (1975) para otras actividades del suelo.

Los efectos obtenidos en la nitrificación a dosis bajas de picloram, en estas experiencias con suelo en percolación, no parecen deberse a la reducción de la población de nitrificantes, como se desprende del estudio de la evolución de la población viable realizado en el mismo suelo, en condiciones de incubación (fig. 9). Además, aunque la actividad de los nitrificantes autotrofos es fácilmente alterada por influencia de las condiciones ambientales, estos microorganismos pueden sobrevivir en ambientes desfavorables durante prolongados periodos de tiempo, aunque no puedan crecer (Painter, 1970).

Los efectos de los herbicidas en la evolución de la po-

blación viable nitrificante se estudiaron en suelos incubados ante las dificultades que suponía el muestreo en los percoladores.- Aunque no sea exacto extrapolar los resultados así obtenidos a las condiciones de percolación, sí pueden éstos indicar que los efectos observados en la nitrificación de suelo en percolación tendrían más que ver con un efecto del herbicida en la actividad o proliferación, que en la viabilidad de los nitrificantes.

En principio un compuesto químico es accesible a los microorganismos en la medida en que se disuelve en la fase acuosa del suelo, así las concentraciones en los ensayos en suelos incubados, se han considerado en base a la fase líquida y estuvieron en el mismo rango que las ensayadas en las experiencias realizadas en condiciones de percolación. El suelo durante la incubación se mantuvo, a lo largo del ensayo, a una humedad del 80% de su capacidad de campo, contenido en agua al cual todas las partículas del suelo se consideran embebidas en el líquido y que ha sido considerado por muchos autores como dentro del rango de humedad óptimo para la actividad nitrificante. Sin embargo, no pretendemos comparar los efectos obtenidos en suelo en percolación, con los obtenidos en suelos incubados a dosis iguales de herbicida, ya que había que tener en cuenta factores como la adsorción a las partículas del suelo. A pH alcalino, tanto el picloram como el 3,6-D (los pK respectivos son 4,2 y 3,7) se encontrarían, principalmente, en forma iónica presentando, así, una baja adsorción (Hamaker y col., 1966). Por otra parte, las propiedades de adsorción de estos compuestos, a los coloides o a las partículas minerales del suelo, serían importantes, ya que se ha considerado que los nitrificantes autotrofos

tienen su localización específica en la superficie de las partículas minerales (Lees y Quastel, 1946), o en lugares del suelo de intercambio de iones ( $\text{NH}_4^+$ ) (McLaren y Ardakani, 1972).

Los efectos producidos por la formulación del 3,6-D utilizada en los ensayos de percolación de suelo, están de acuerdo con la tolerancia observada para la misma, así como para el 3,6-D puro, en Nitrosomonas europaea y Nitrobacter agilis en cultivo puro.

A diferencia de lo ocurrido con picloram, el producto formulado del 3,6-D produjo estimulación de la nitrificación, menor a medida que aumentó la dosis, llegando, incluso, a presentarse cierto retardo a 1000 ppm de 3,6-D (fig. 6). El ligero efecto estimulante que parece observarse en N. agilis en cultivo puro no es suficiente para explicar los anteriores resultados, además de que la estimulación obtenida en la nitrificación global, ocurrió paralelamente en la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ , mientras N. europaea, en cultivo puro, no se vió afectada (tabla 15).

La formulación utilizada incluye el 3,6-D como sal de etanolamina y, aún no siendo este último compuesto útil a los autotrofos nitrificantes como sustrato oxidable, cabe la posibilidad de que la etanolamina tenga efectos en la nitrificación. Los efectos de algunas aminas en la nitrificación de suelo, han sido observados por Quastel y Scholefield (1951) y Lees y Quastel (1946). Estos autores encontraron que estos compuestos eran nitrificados con gran retraso respecto del  $\text{NH}_4^+$ . Además un suelo pretratado con eta

nolamina produjo  $\text{NO}_3^-$  a partir de  $\text{ClNH}_4^+$ , a velocidad constante sin periodo de latencia inicial. La etanolamina, por otra parte, no afectó la respiración de suelos enriquecidos en nitrificantes por pretratamiento con  $\text{ClNH}_4^+$ . Todo esto sugiere que la etanolamina no inhibe la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  a cargo de los nitrificantes y, por otra parte, parece ser que no es oxidada directamente por los nitrificantes autotrofos, debiendo ser atacada previamente por la flora heterotrofa con liberación del  $\text{NH}_4^+$ . Ya que los niveles máximos de  $\text{NO}_3^-$  obtenidos para los distintos tratamientos, no fueron diferentes de los del control, no parece que la estimulación sea debida a nitrificación de la etanolamina, salvo que, dado que el herbicida estuvo en contacto con el suelo de 24 a 48 horas antes de que fuera realizada la percolación, alguna liberación de  $\text{NH}_4^+$  ocurriese y la flora nitrificante iniciase su proliferación antes que el control sin herbicida.

No podemos explicar el efecto estimulante producido por este herbicida en la nitrificación de suelo en percolación, que podría responder a un efecto primario en la oxidación de  $\text{NH}_4^+$  y estaría de acuerdo con la evolución de la población nitrificante observada en suelos incubados (fig. 9).

Los ensayos de nitrificación de diluciones de suelo se plantearon con el objeto de tener una aproximación de los efectos de los herbicidas en este proceso y en el suelo bajo estudio. En este sentido, los resultados obtenidos no han sido muy útiles. Por un lado, las inhibiciones observadas según estas técnicas, no correspondieron a los efectos encontrados en los ensayos de percola

ción de suelo. Así la formulación de picloram produjo una notable inhibición de la nitrificación de suspensiones de suelo (tabla 3) que no parece ocurrir en el suelo en percolación (fig. 2, 3 y 5) y que sin embargo no llegó a ser una inhibición total como la obtenida en Nitrosomonas sp. y Nitrobacter sp. , en cultivo puro - (tablas 15 y 18 ). En el caso de la formulación de 3,6-D la inhibición resultó también más marcada en las suspensiones que en la percolación (fig. 6 y 8) y, por otra parte, no se correspondió con la inocuidad obtenida para los nitrificantes en cultivo puro (tablas 15 y 18).

En estas diferencias, quizás, estén implicadas las variaciones cualitativas y cuantitativas de la microflora y actividades del suelo, en las que el factor dilución puede influir considerablemente y afectar así a los nitrificantes. Fleig (1952) observó - una considerable inhibición de la nitrificación de suspensiones de suelo por 2,4-D a concentraciones no tóxicas en suelo , anulándose este efecto con la adición de una mayor cantidad del mismo. Bialicka y Sobieszczanski (1969) refieren, también, inhibición de la nitrificación en suspensiones de suelo por varios herbicidas, inhibición que aumentó con la dilución y que no fue observada en las - experiencias con suelos incubados, en las que se dieron, incluso, casos de estimulación.

#### 4.1.3. Comparación de los resultados con datos bibliográficos sobre los derivados de piridina

Un compuesto derivado de piridina, N-Serve (2-Cl,6-(tri-

clorometil) piridina), es un potente inhibidor de la nitrificación y por ello se utiliza en la práctica como tal. Su efectividad resultó variable según el tipo de suelo (Bundy y Bremner, 1973) y - posiblemente esté relacionada con el tiempo de permanencia del tóxico en el mismo (Lewis y Stefanson, 1975). La inhibición de la nitrificación por N-Serve parece ser específicamente sobre las bacterias autotrofas nitrificantes: mientras no fueron afectados algunos heterotrofos nitrificantes en cultivo puro (Shattuck y Alexander, 1963), muy bajas concentraciones de N-Serve (0,2 ppm) inhibieron Nitrosomonas sp. y, aunque a mayor dosis, también Nitrobacter sp.; los iones  $Cu^{++}$  revirtieron la inhibición en ambas cepas (Campbell y Aleem, 1965, a y b). Según nuestros ensayos, cepas de las mismas especies de nitrificantes autotrofos, N. europaea y N. agilis, toleran dosis mucho mayores de picloram ó 3,6-D, comparadas con las del citado derivado de piridina.

No hemos encontrado otros trabajos sobre los efectos de estos derivados de piridina en la nitrificación, excepto los referentes al picloram. La mayoría están realizados en suelo incubado y, quizás, por la diversidad de los tipos de suelo bajo ensayo, se hayan obtenido resultados muy distintos. Por otra parte, la valoración de los efectos se basó en la determinación de nitratos alcanzados después de un cierto periodo de incubación en presencia del herbicida. Así, según Dubey y Rodríguez (1970), el picloram, a dosis de 2 ppm, inhibió la nitrificación durante el periodo de 8 semanas del ensayo en algunos de los suelos utilizados; mientras que en otros, a 100 ppm, sólo se retrasó ligeramente. Sin embargo Goring y col. (1967) obtuvieron inhibición únicamente en la etapa de oxida-

ción de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ . Debona y Audus (1970), en ensayos en percolación, refieren un 50% de inhibición en la velocidad de nitrificación en suelo enriquecido y en presencia de 50 ppm de picloram, - mientras que en suelo no pretratado con  $\text{NH}_4^+$  la reducción de la velocidad máxima se obtuvo a dosis ligeramente mayores, sugiriendo, estos autores, que podría darse una cierta adaptación de los nitrificantes al picloram.

Nuestros resultados coinciden con los que refieren para el picloram una baja toxicidad en los nitrificantes. La capacidad nitrificante inherente de un suelo parece ser determinante de los efectos producidos por los herbicidas. El suelo que hemos empleado se puede considerar de alta capacidad nitrificante, al igual que - la de los suelos en los que otros autores obtuvieron escaso efecto del herbicida. Aunque no se puede descartar que los diferentes e-fectos dependan de la diversidad de especies nitrificantes del suelo, las condiciones microambientales en el mismo parecen tener de cisiva importancia. Domsch y Paul (1974) observaron que la inhibición por herbicidas era solamente detectada en suelos con relativa baja capacidad tamponadora. En este sentido Dubey obtuvo considerarable inhibición con picloram en los suelos de pH próximo a 5 (en - los ensayos fue llevado a pH 6) y presentaron una baja capacidad nitrificante que aumentó considerablemente al ser añadida suficiente cantidad de carbonato cálcico; llegandose también a este resultado cuando al suelo se le añadió una suspensión de otro suelo de alta capacidad nitrificante.

#### 4.2. Efectos del picloram y 3,6-D en Rhizobium spp.

##### 4.2.1. Interés de su investigación e importancia de las cenizas de Rhizobium bajo ensayo

La fijación de  $N_2$  por leguminosas es de reconocida importancia económica en la agricultura. El cultivo periódico de leguminosas en suelos dedicados a cereales es un medio de restitución de nitrógeno en el suelo, empleado tradicionalmente y que se ha valorado más justamente ante la carestía de los fertilizantes. Así la necesidad del estudio de los efectos de productos químicos aplicados al suelo sobre el Rhizobium se polariza no sólo en aquellos que lo son a cultivos de leguminosas, sino que presenta interés de mayor importancia y amplitud ecológica el estudio de la acción de otros compuestos, como es el caso de los herbicidas estudiados, aplicados fuera del tiempo de cultivo de las leguminosas a otros cultivos que ocupan grandes extensiones de terrenos agrícolas, como los cereales, o a suelos que son ganados para la agricultura o el pasto, caso este último en que la cantidad de producto aplicado puede ser considerablemente elevada. La adsorción de partículas de suelo a las células de Rhizobium ha sido demostrada (Marshall, 1969), así cantidades relativamente grandes de herbicida podrían estar en contacto con las células de Rhizobium.

La nodulación de las leguminosas, en muchos casos, dependerá de la supervivencia de la población nativa de Rhizobium en el suelo, ya que la mayoría de las leguminosas se cultivan sin previa inoculación, en muchos países. Por ello es obvio el interés por la

protección de la flora nativa de Rhizobium y máxime si se halla en condiciones precarias de supervivencia por ausencia de su leguminosa huésped durante periodos de tiempo más o menos largos.

Frente a la semejanza de estructuras químicas del picloram y 3,6-D se presenta una aplicación agrícola principal distinta en cada uno de ellos, en razón, fundamentalmente, a su persistencia en el suelo; siendo, los efectos de estos herbicidas en la flora nativa de Rhizobium, de interés en cuanto a distintos aspectos de los mencionados anteriormente.

El interés de las cepas de Rhizobium elegidas en este trabajo reside en la importancia económica de su huésped vegetal, o en su reconocida eficiencia en la fijación de nitrógeno. Así, los tréboles se encuentran entre los más efectivos fijadores de  $N_2$  y son frecuentemente útiles en la práctica agrícola en orden al mantenimiento de la fertilidad del suelo, así como en la implantación de praderas o pastizales. Serradella y lotos son asimismo de gran importancia en pastizales contribuyendo, por otra parte, sobre todo los últimos, en gran medida a la fijación biológica de nitrógeno en el suelo (tabla 30).

En cuanto al Rhizobium de garbanzo, está aún muy poco estudiado, sobre todo en su aspecto ecológico; sin embargo, el cultivo del garbanzo está considerado como de gran importancia alimenticia (Fao, 1972), ocupando una posición clave en la dieta de los pueblos de zonas semiáridas de los trópicos (Kanwar, 1975) y siendo España uno de los países europeos con mayor cultivo (Murty, 1975).

Tabla 30. Estimaciones representativas de la fijación de N<sub>2</sub> por leguminosas (Kg/Ha)

---

Alfalfa	50 - 500
Tréboles	50 - 200
Lotos	190
Pastizales de leguminosas	10 - 170
Soja	40 - 600
Legumbre tropical	20 - 260

---

Por otra parte, la mayoría del nitrógeno obtenido por esta leguminosa procede de fijación simbiótica, no habiéndose conseguido respuesta positiva con la aplicación de fertilizantes nitrogenados, (USDA, 1968), además de que la nodulación, actualmente, depende de la flora nativa de Rhizobium presente en el suelo (Saxena y Yadav, 1975).

Las cepas de Rhizobium utilizadas en nuestros ensayos fueron aislados de un suelo de pH 4,5-5, habitat atípico para este género bacteriano y que sin embargo albergó una gran variedad de especies de leguminosas silvestres a la vez que rizobios a niveles de población considerables, llegándose a alcanzar hasta 10<sup>4</sup> rizobios por gramo de suelo.

Las cepas seleccionadas se distribuyen en grupos de inoculación y fisiología muy diversos, a la vez que se han escogido algunas por la semejanza de características fisiológicas (tablas 19 y 20) ante la tendencia que sostiene la estrecha relación de los

efectos de herbicidas con la cepa, además de con la especie de Rhizobium.

#### 4.2.2. Efectos en el crecimiento

Las toxicidades de los herbicidas picloram y 3,6-D pueden considerarse dentro del mismo orden para ambos, en las distintas cepas de Rhizobium bajo ensayo.

Los resultados del crecimiento, cuando los rizobios se cultivaron en medio líquido a pH 6,8, no revelaron grandes diferencias de sensibilidades entre las distintas cepas a dosis subbacteriostáticas de los herbicidas, salvo la rapidez de adaptación, quizá, en relación con la velocidad de crecimiento de cada cepa (fig. 14 y 15). Sin embargo, según la extensión de la zona de inhibición obtenida en medio sólido (dosis de aplicación superiores a las ensayadas en medio líquido) se presentan algunas diferencias de sensibilidad entre las distintas cepas, que parecen estar más de acuerdo con los resultados obtenidos en medio líquido cuando el pH se llevó a 5,5. Así, en la inhibición encontrada en medio sólido podría estar implicada una caída del pH de dicho medio a causa de la introducción del herbicida, sobre todo cuando se trató del 3,6-D.

Entre las características fisiológicas diferenciales de las cepas ensayadas con implicación en el comportamiento frente a los herbicidas es de destacar la capacidad de modificación del pH del medio de cultivo, como reflejo de su metabolismo; -

además de que el pH es un factor que influencia la penetración de ciertos compuestos hacia el interior de la célula. Los pK respectivos del picloram y 3,6-D son 4,2 y 3,7, de forma que su penetración se podría ver facilitada al disminuir el pH del medio de cultivo. De las cepas bajo ensayo, algunas son alcalinizantes (B-7 y B-12) y otras acidificantes (Ts-7, Tr-3 y Ca-7) cuando se cultivan en EM, medio utilizado para la clasificación de los rizobios en los tipos anteriores (Vincent, 1970); sin embargo, nosotros hemos realizado todas las experiencias con herbicidas en Rh<sub>6</sub>, medio que facilitó la manipulación en los ensayos donde fue requerida reducción en la producción de mucílago. Independientemente del medio de cultivo, B-7 y B-12 fueron cepas alcalinizantes y Tr-3 y Ts-7 acidificantes, sin embargo, la Ca-7 subió el pH inicial 6,8 del medio Rh<sub>6</sub>. Por otra parte, cuando las anteriores cepas se cultivaron a pH 5,5, todas elevaron el pH como consecuencia de su crecimiento (tabla 25), pero algunas como la Ca-7 y Ts-7 fueron incapaces de llevar a cabo esta alcalinización cuando se cultivaron en presencia de herbicida (tabla 25), reflejándose este hecho quizá en las diferencias de sensibilidad a los herbicidas, obtenidas a pH 5,5 en medio líquido (fig. 16 y 17) y, quizá también, en la bacteriostasis observada en medio sólido.

Se ha referido que la variación del pH del medio de cultivo, como consecuencia del metabolismo bacteriano, incrementa o disminuye la toxicidad de un compuesto químico. Kaszubiak (1968a) obtuvo mayor resistencia al Aretit en R. Meliloti, atribui

da a la alcalinización del medio de cultivo y además, las cepas más resistentes a este herbicida elevaron el pH más rápidamente.

De nuestros resultados se deduce que no hubo grandes diferencias de sensibilidad entre las distintas cepas para ninguno de los herbicidas, pudiéndose decir, además, que la sensibilidad fue más bien específica que relacionada con la cepa, ya que, por un lado, las cepas Tr-3 y Ts-7 de R. trifolii y por otro B-7 y B-12, de características fisiológicas muy semejantes, mostraron similar respuesta. Sin embargo, la tendencia actual parece ser la de aceptar que la sensibilidad de Rhizobium a los plaguicidas es dependiente, más de la cepa, que de la especie (Grossbard, 1976), - habiéndose obtenido gran diversidad de tolerancias dentro de las cepas de una misma especie, al mismo compuesto (Kapusta y Rouwenhorst, 1973). Además las cepas más sensibles a ciertos herbicidas lo fueron, en general, a compuestos químicos muy diversos (Makawi y Abdel-Ghaffar, 1970).

Por otra parte, ha sido frecuentemente referida una mayor tolerancia a los plaguicidas por parte de rizobios de crecimiento rápido, como R. meliloti y, sobre todo, R. trifolii y R. leguminosarum (Kaszubiak, 1966; Gillberg, 1971), que por las de crecimiento lento R. lupini y R. japonicum. Sin embargo, otros autores obtuvieron lo contrario (Carlyle y Thorpe, 1947; Jensen y Petersen, 1952; Lehri y Prasad, 1976), coincidiendo con nuestros resultados. Habría que considerar que las especies de crecimiento rápido corresponden, en general, al grupo de las acidificantes del medio de

cultivo y las de crecimiento lento, por el contrario, a cepas alcalinizantes. Parece más convincente relacionar la sensibilidad de los rizobios a los plaguicidas con su fisiología, que con la velocidad de crecimiento, que por otra parte, obviamente estarían relacionadas. Kaszubiak (1966) sugiere que la mayor resistencia a los plaguicidas por parte de rizobios de crecimiento rápido, podría estar relacionada, en general, con su mayor vitalidad y capacidad de adaptación.

De los herbicidas bajo estudio, picloram y 3,6-D, hay muy pocos trabajos, no sólo referentes a los efectos sobre Rhizobium, sino también sobre otros microorganismos "in vitro". Rhizobium ha sido descrito como un género relativamente tolerante a los plaguicidas y, en particular, frente a los herbicidas hormonales (Vincent, 1977). Nosotros hemos obtenido una considerable resistencia al picloram y 3,6-D por parte de todas las cepas bajo ensayo que está de acuerdo con la observada por Goring y col. (1967) en una cepa de R. phaseoli, la cual creció en medio sólido con 1000 ppm de picloram (como Tordon 22K). En más del 50% de un total de 17 cepas de R. meliloti no se produjo inhibición del crecimiento al rededor de bloques de agar, conteniendo 1,5 mg de picloram (como Tordon 22K) y a 3 mg la mayoría fueron sensibles presentando halos de inhibición de 1-2 mm (Camugli y Gómez-Etchart, 1974). Este rango de dosis está muy próximo al de nuestro ensayo, aunque nosotros hemos obtenido sensibilidades más marcadas, para otras especies de Rhizobium y con la diferencia de haber utilizado picloram puro.

La tolerancia de los rizobios al picloram parece darse -

también en otros microorganismos. Así Goring y col., 1967) en una amplia gama de organismos aerobios del suelo entre los que se encontraban bacterias, hongos y Streptomyces sp, no vieron inhibición a concentraciones tan altas como 1000 ppm de picloram (como Tordon 22K); sólo observaron efecto en Thiobacillus tioxidans. Sin embargo, según Breazeale y Camper (1972), Pseudomona fluorescens a 50 ppm de picloram, disminuyó en un 30% su velocidad de crecimiento, mientras esta dosis no afectaba a Erwinia carotovora y Bacillus sp. A 200 ppm de picloram, Bdellovibrio bacteriovorus fue ligeramente inhibido (Wehr y Klein, 1971).

#### 4.2.3. Efectos en el consumo de oxígeno

Los efectos de plaguicidas en la respiración de los microorganismos han sido, a menudo, observados por revelar efectos en el metabolismo o actividad a nivel de membrana plasmática.

Nuestros resultados mostraron una clara estimulación del consumo de oxígeno con la adición de picloram y en presencia de manitol, por parte de células que no habían sido adaptadas al herbicida; estimulación que ocurrió en todas las cepas bajo ensayo y resultó de la misma magnitud en el intervalo de concentraciones ensayadas (50-300 ppm) (ver figura 18). Grossbard (1975) obtuvo estimulación de la respiración de R. trifolii (150-180%) a concentraciones de dinoseb (derivado de dinitrofenol) entre 2 y 50 ppm, mientras el recuento de viables se vió considerablemente reducido desde la dosis más baja ( en un 50% a 25 ppm). Sin embargo, a concentraciones de picloram estimulantes de la respiración, nosotros no -

obtuvimos inhibición del crecimiento; sólo se presentó un periodo de latencia, respecto del control, variable según la dosis, pero manteniéndose la velocidad de crecimiento al pH 6,8-7,0 de ambos ensayos. Dado que los efectos en el crecimiento pueden deberse a acciones a distintos niveles, los producidos por muchos compuestos químicos sobre la respiración y crecimiento celular, a menudo, no son paralelos.

El picloram podría actuar como desacoplador de la fosforilación oxidativa, como los dinitrofenoles, aunque ni el crecimiento, ni la viabilidad celular se hayan visto afectados a las dosis de ensayo. Se ha sugerido que este herbicida y otros reguladores del crecimiento, actúan como desacopladores en la célula vegetal, aunque su actividad herbicida se considere más bien debida a su acción como compuestos reguladores del crecimiento (Ashton y Crafts, 1973). La estimulación de la respiración en células bacterianas en contacto con ciertos compuestos, ha sido referida frecuentemente, a la vez que se observaba acción similar en células vegetales. Así, ioxinil mostró un incremento del consumo de  $O_2$  cuando se añadió a células de Erwinia carotovora (Hsu y Camper, 1973), estimulación que había sido referida anteriormente para células de tejidos vegetales (Moreland, 1967), sugiriéndose para este herbicida la acción como desacoplador.

Otra posibilidad sería que el estímulo en la respiración por picloram, fuese debido a cambios en la permeabilidad de la membrana y subsiguiente incremento de la accesibilidad del sustrato oxidable al interior de la célula. Muchos herbicidas con acción au-

xina modifican la permeabilidad celular en vegetales (Ashton y - - Crafts, 1973), reflejándose en el transporte iónico. El efecto a es te nivel, en general, deberá ser común en procariontes y eucariontes, excepto en ciertos casos, como por ejemplo cuando se implican actividades o componentes propios de cada una de sus membranas. Así, la inhibición de la respiración y crecimiento por triadimefon en hongos, no ocurrió en Rhizobium, ya que este fungicida parece actuar a nivel de esteroides, no presentes en la membrana bacteriana (Fisher y col., 1979). Por el contrario, el estímulo de la respiración (120-130% a dosis entre 100 y 300 ppm), atribuido a cambios en la permeabilidad de la membrana, ocurrió, tanto en R. trifolii como en protoplastos de hongos y plantas (Fisher, 1974). Con algunos fungicidas surfactantes, como Alk 3, se obtuvo una ligera estimulación de la respiración de R. trifolii (Fisher y col., 1978), sin afectar su crecimiento.

Por otra parte, el incremento en el consumo de  $O_2$  podría deberse a la utilización del herbicida como sustrato oxidable por parte de la bacteria. Pero según nuestros resultados, el picloram no parece útil como fuente de energía. Asimismo se descarta esta posibilidad ante el hecho de que el consumo de  $O_2$ , por células adaptadas al herbicida, no se vió afectado en presencia o ausencia del mismo (figuras 22 y 23).

A diferencia de lo ocurrido con el picloram, y aún a pesar de la similitud de sus estructuras químicas, el 3,6-D no produjo ningún efecto en el consumo de  $O_2$ . Las diferencias de propiedades fisicoquímicas, fundamentalmente la carga de sus moléculas, puede -

que sean decisivas en la acción sobre la membrana plasmática.

Parecen contradictorios los resultados de los distintos autores en cuanto al efecto estimulante observado sobre la respiración, a la vez que sobre el crecimiento de Escherichia coli y levaduras, producido por IAA y por el ácido  $\alpha$ -naftilacético (Audus, 1964). Además, es de esperar una gran variedad de respuestas ante la diversidad en la estructura química de los compuestos con acción tipo auxina. Así, frente al efecto estimulante, anteriormente citado para las auxinas naturales, se ha referido inhibición de la respiración a dosis subletales de 2,4-D en E. coli y Aerobacter aerogenes y a dosis muy pequeñas en algunas bacterias gram + (Lamartiniere y col., 1969), así como en varias especies de hongos (Smith y Shennan, 1966; Plamadeala, 1972).

#### 4.2.4. Efectos en el contenido de RNA y proteína

Muy frecuentemente dosis de un herbicida que no producen efecto en el crecimiento de los microorganismos, han resultado modificar su metabolismo. Así Dubos (1946) obtuvo reversión de la bacteriostasis producida por algunas auxinas con la adición de peptona o triptófano. La excreción de aminoácidos libres fue estimulada o inhibida según la bacteria, en presencia de atrazina (Balicka y Bilodub-Pantera, 1964). El mismo herbicida afectó la síntesis de IAA por Arthrobacter sp. a concentraciones no inhibitorias del crecimiento (Grapelli y Rossi, 1979).

Nosotros hemos estudiado los efectos de los herbicidas -

picloram y 3,6-D, a dosis subbacteriostáticas, en el contenido de RNA y proteína totales de los rizobios, ante la respuesta obtenida por un considerable número de autores (Ashton y Crafts, 1973 y - Moore, 1979) con herbicidas hormonales, incluido picloram, en los constituyentes celulares de tejidos vegetales, como es el incremento de RNA, fundamentalmente. Incluso se ha postulado que la actividad hormonal de tipo auxina, es debida a la acción sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y que el efecto herbicida podría responder a una excesiva síntesis de RNA y proteína (Shannon y col., 1964).

En el hongo Neurospora crassa, sólo se incrementó el contenido de DNA y RNA en presencia de 2,4-D y no con el resto de los herbicidas, no hormonales, incluidos en los ensayos. Además, el mayor incremento correspondió al RNA, llegando a ser hasta del 140%, superior al del hongo creciendo en ausencia de herbicida y sin que se observaran efectos en el crecimiento (Schroder y col., 1970).

En plantas, el tratamiento con 2,4-D a dosis herbicidas muy frecuentemente produjo aumento del contenido de DNA, de proteína y sobre todo de RNA (Moore, 1979). Según West y col. (1960) el RNA de la fracción microsomal fue el más incrementado. La respuesta parece depender de la madurez del tejido y de la especie vegetal. Cheng y col. (1972) observaron, con los herbicidas hormonales estudiados -entre ellos el picloram- un aumento del contenido de DNA y proteína; pero en cuanto al RNA la respuesta varió según se tratase de una planta sensible o resistente al herbicida. Así, mientras en las últimas el contenido de RNA disminuyó, en las sen

sibles se elevó a un 200% con descenso de la proporción proteína / RNA.

Se ha sugerido que la adición de herbicida en plantas, - provoca transcripción selectiva de DNA. Así se obtuvo incremento de actividad DNA polimerasa en hipocotilo de soja tratado con 2,4-D (Moore, 1979). Por otra parte, los niveles endógenos de DNA-asa y RNA-asa, fueron superiores en las plantas resistentes que en las - sensibles (Malhotra y Hanson, 1970), sugiriéndose que la síntesis de RNA podría, igualmente, haber sido estimulada en plantas sensibles y resistentes.

Nuestros resultados parecen apuntar a un cierto incremento en el contenido de RNA, mientras la proteína permaneció claramente invariable en las condiciones de nuestro ensayo. Este incremento - de un 10% por término medio -, observado en dos de las cepas, se dió a las dos dosis de ensayo de cada uno de los herbicidas; las cuales habían permitido un crecimiento muy semejante al del control y después de un corto periodo de adaptación en el caso de la dosis más alta. A esta dosis, el incremento fue ligeramente superior, aunque no en todas las cepas. Ante estos resultados, y a falta de trabajos en organismos procariontes, no podemos decir nada sobre si los efectos son similares a los obtenidos en eucariontes, ni si la adaptación bacteriana supondría el control de la excesiva síntesis de RNA provocada por los herbicidas, ni tampoco si un cierto aumento de RNA y proteína es requerido para la adaptación.

#### 4.2.5. Naturaleza de la adaptación

La resistencia de Rhizobium a los herbicidas picloram y 3,6-D, parece ser el resultado de una adaptación fisiológica de la bacteria, más que la consecuencia de una selección de parte de la población, o de la inducción por el herbicida de mutantes resistentes. Por otra parte, como consecuencia de la adaptación no hemos detectado cambios genéticos en las células de rizobios. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones:

- El tiempo de latencia en el inicio del crecimiento, observable a partir de ciertas dosis de cada uno de los herbicidas y hasta las 400 y 1000 ppm del ensayo, respectivamente para picloram y 3,6-D, nunca superó el tiempo de generación cuando se cultivaron en medio Rh<sub>6</sub> a pH 6,8, a la vez que la velocidad de crecimiento permaneció constante respecto al control sin herbicida. Este periodo de latencia no respondió a la acción letal de los herbicidas sobre la población en ninguna de las cepas de Rhizobium - (según los resultados de la tabla 26). A pH 5,5 la adaptación podría ser de la misma naturaleza (fig. 16), aunque en algunos casos (fig. 17) la velocidad de crecimiento fue reducida con la presencia de herbicida y el tiempo de latencia considerablemente mayor que el obtenido a pH 6,8.

- No se ha encontrado que los rizobios adaptados a los herbicidas presentasen diferencias en la resistencia a ninguno de los dos antibióticos ensayados (estreptomina y kanamicina), con respecto a los no adaptados; indicando que estos herbicidas no ac

túan como agentes selectivos de ciertos mutantes preexistentes ni como inductores de mutación. Por otra parte, se obtuvo la misma sensibilidad relativa a los herbicidas por parte de una cepa nativa y dos mutantes de la misma, resistentes a antibióticos (fig. 24), lo que podría ser indicativo de la homogeneidad de la población de estas cepas nativas de Rhizobium, en cuanto a la respuesta a los herbicidas. Además, a veces la resistencia a ciertos tóxicos se debe a cambios genéticos pero de efectos no específicos; por ejemplo, podría modificarse la permeabilidad de la membrana celular, y en este sentido, la tolerancia a un tóxico podría variar por efecto de otro como ha sido referido para algunos antibióticos en distintas bacterias (Szybalsky y Bryson, 1952) y ciertos herbicidas en Rhizobium (Kaszubiak, 1966).

- Ninguna de las cepas de Rhizobium bajo estudio fueron capaces de utilizar estos herbicidas como única fuente de carbono y energía (apartado 3.2.5 de Resultados), aún cuando los rizobios fueron cultivados previamente en su presencia. Nosotros no hemos investigado la desaparición de los herbicidas en el medio de cultivo, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que puedan ser degradados por Rhizobium; sin embargo, en los ensayos de respiración de células adaptadas a estos compuestos, es de destacar que en ningún caso se vió diferencia en el oxígeno consumido cuando el herbicida era añadido a las células, junto con manitol, o cuando estuvo presente sólo el azúcar (fig. 22 y 23). Según los datos bibliográficos, la capacidad de los microorganismos en cultivo puro, para degradar el picloram, sólo fue obtenida en presencia de fuente de carbono adicional y por parte de un restringido número de géneros de

bacterias, como Arthrobacter, Agrobacterium y Bacillus, y de hongos, Aspergillus y Penicillium (Youngson y col., 1967; Vasil'chenco y col., 1975). Sobre el 3,6-D no podemos aportar datos de su degradación por microorganismos en cultivo puro, aunque los estudios en suelo revelan una mayor susceptibilidad que el picloram a la degradación biológica.

La resistencia de Rhizobium spp. a muchos compuestos plaguicidas es debida frecuentemente a su capacidad de adaptación fisiológica más que a la selección de mutantes o a la inducción de mutación; y así parece ocurrir particularmente con muchos compuestos con actividad auxínica, como se ha descrito para la auxina natural IAA (Dullaart y col., 1971) y el herbicida 2,4-DB (Jordan y García, 1969).

Según Kaszubiak (1968a), dosis no selectivas de varios herbicidas pertenecientes a diversos grupos, entre ellos algunos hormonales, no produjeron aumento de la resistencia de Rhizobium spp.. Por otra parte, Gillberg (1971) refiere que los resistentes obtenidos a dosis selectivas de algunos herbicidas (incluido MCPA) lo fueron más que la cepa parental. A menudo, los intentos de aislamiento de mutantes resistentes a plaguicidas han fracasado. Golebiowska y col. (1967) no lo lograron con tiuram, después de sucesivas transferencias en medio conteniendo el fungicida; por otra parte, aunque se hubieran obtenido de esta manera no se garantizaría que fueran resistentes desde el punto de vista genético. Sin embargo, entre los rizobios supervivientes a tratamiento ultravioleta estos autores sí obtuvieron un aumento de los resistentes al

fungicida.

#### 4.2.6. Efectos en la simbiosis Rhizobium-leguminosa

En la valoración de los efectos producidos por los herbicidas en Rhizobium spp. en relación a la eficacia de la simbiosis con las leguminosas, se han comparado distintos parámetros, entre los cuales hemos considerado de la máxima importancia, la actividad nitrogenasa de los nódulos. Para su valoración ha sido utilizada la técnica de reducción de acetileno que, por su precisión, es actualmente la más aceptada. Además se han determinado otros parámetros relacionados con la eficacia de la infectividad de los rizobios, según el pretratamiento herbicida (número y peso de los nódulos), así como el peso seco de las plantas, reflejo último de la eficacia de la simbiosis.

Los anteriores parámetros fueron incluidos en un trabajo realizado por Johnen y col. (1979), en relación con los efectos de herbicidas, en el cual fueron valorados también, el nitrógeno total de la planta y el de algunas partes de la misma. Los resultados de estos autores fueron obtenidos cuando el compuesto era aplicado al suelo, en contacto con la leguminosa, no excluyéndose, así, la posibilidad de que los efectos pudieran ser debidos a la acción ejercida sobre la planta. En nuestro ensayo se trató de eliminar el herbicida del inóculo de Rhizobium y así, en principio, los efectos en la simbiosis serían debidos sólo a la acción ejercida sobre la bacteria, salvo que restos de los herbicidas permanecieran en el inóculo y que en el caso de picloram y 3,6-D tendrían

gran efecto en el desarrollo de la leguminosa. La correlación obtenida por los citados autores para los distintos parámetros, fue mayor entre los valores de etileno producido con el peso de los nódulos que con el peso de la planta y el número de nódulos, en este orden. Además los tres parámetros anteriores presentaron muy pequeña correlación con el nitrógeno total de la planta y menos aún con el de distintas partes de la misma.

Nuestros resultados, obtenidos con Cicer sp., están de acuerdo con la tolerancia al picloram y al 3,6-D observada en la cepa Ca-7 en vida libre, y no vamos a comentarlos en los términos de la anterior discusión. La estimulación de la nodulación parece responder al incremento del número de nódulos, ya que aumentaron paralelamente tanto el número como el peso total de nódulos por planta (tabla 27). Sin embargo, a pesar de que las cepas Ts-7 y B-7, en vida libre, no presentaron diferente comportamiento frente a los herbicidas, al de la cepa Ca-7, la eficacia de su simbiosis con las respectivas leguminosas resultó afectada por el pretratamiento herbicida a que fueron sometidos los rizobios. En el caso de las plantas de trébol los dos herbicidas redujeron la actividad nitrogenasa y esta reducción se manifestó en un descenso del peso de la planta, mientras la nodulación, salvo en el caso de 400 ppm, no se vió afectada. Las relaciones observadas entre estos parámetros están de acuerdo con las obtenidas por Johnen y col. En loto observamos similares resultados, además de que hubo disminución en el peso de los nódulos sin que fuese resultado de la reducción de su número y por tanto debido a la disminución del tamaño. Un resultado común observado en los dos sistemas Rhizobium-leguminosa, an-

teriores es que no se produjo disminución del número de nódulos - por el tratamiento herbicida y que la reducción del peso de la - planta correspondió a una reducción de la actividad fijadora de  $N_2$ .

Los efectos negativos de los herbicidas en la simbiosis Rhizobium-leguminosa parecen debidos a la acción de los mismos en la planta, quizás, a causa de los residuos que puedan ir en el inóculo, adsorvidos a los rizobios, o en su interior, puesto que las leguminosas son muy sensibles, tanto al picloram, como al - - 3,6-D. Nosotros hemos observado que plantas de trébol inoculadas y cultivadas en tubo de ensayo en presencia de 0,5 ppm de cualquiera de los herbicidas, fueron muy afectadas en su crecimiento, mientras que la nodulación no se vió prácticamente afectada, a pesar de que la raíz de la planta sí apareció alterada en su morfología y desarrollo. La actividad nitrogenasa de los nódulos, de esta manera, podría venir limitada por el aporte de materiales fotosintetizados por la planta. Por otra parte, las sustancias reguladoras del crecimiento, tipo auxina, parecen estar implicadas en el inicio del desarrollo del nódulo (Libbenga y Bogers, 1974), por lo que los herbicidas picloram y 3,6-D, a bajas dosis, quizás no ejerzan ningún efecto, o incluso, estimulen la nodulación, como hemos observado en algunos de nuestros ensayos (tabla 27 y 28).

## 5. C O N C L U S I O N E S

El presente trabajo pone de manifiesto la notable tolerancia a los herbicidas derivados de piridina, picloram y 3,6-D, por parte de grupos microbianos muy diferentes fisiológica y nutricionalmente: los autotrofos nitrificantes, Nitrosomonas sp. y Nitrobacter sp., y especies del género heterotrófico Rhizobium.

De los estudios sobre la nitrificación se han obtenido las siguientes conclusiones:

1) Ni el picloram ni el 3,6-D, a dosis comprendidas dentro de los respectivos límites de solubilidad en agua (400 y 1000 ppm), tienen efecto en dos de las especies nitrificantes más comunes en el suelo, Nitrosomonas europaea y Nitrobacter agilis, en cultivo puro, al igual que la formulación del 3,6-D, Lontrel 300; mientras que la formulación del picloram, Tordon 22K, produjo una notable inhibición del crecimiento de ambas cepas.

2) La formulación del picloram, Tordon 22K, en el rango de dosis anterior, redujo transitoriamente la nitrificación de suelo en percolación, con incremento variable en la acumulación de nitratos según la dosis. Este efecto sobre la nitrificación parece ser debido a una acción indirecta quizá a causa de la interacción de otras actividades del suelo y así del microhabitat de los nitrificantes, siendo el factor suelo importante en el efecto obtenido. Esto podría apoyar la consideración del proceso de nitrificación como indicador de efectos ejercidos por compuestos químicos en la actividad del suelo o en el equilibrio de su microflora. Por el contrario la formulación de 3,6-D estimuló las dos etapas de la nitrificación a dosis semejantes en producto activo que el picloram.

3) El suelo modifica la respuesta de la microflora nitrificante a estos herbicidas. Por una parte, actuó como protector disminuyendo, en algunos casos, la toxicidad, como ocurrió con el Tordon 22K. Por otra parte, al introducir el factor suelo, la formulación del 3,6-D, inhibió la nitrificación de suspensiones de suelo, mientras que no fue patente esta inhibición ni en la nitrificación de suelo en percolación, ni en Nitrosomonas sp. y Nitrobacter sp. en cultivo puro.

Los estudios sobre Rhizobium spp. nos permiten concluir:

1) El género Rhizobium presenta una considerable y similar tolerancia a los dos herbicidas, no observándose bacteriostasis, ni reducción de la viabilidad de los rizobios, a las correspondientes dosis de solubilidad máxima en agua.

2) La sensibilidad de Rhizobium spp. fue similar en todas las cepas; solo se pusieron de manifiesto algunas diferencias a pH ácido del medio de cultivo, en relación con las diferentes características fisiológicas de las distintas cepas.

3) La adaptación de los rizobios a estos herbicidas es una adaptación fisiológica y no el resultado de una selección o inducción de mutantes. Además, la población resultó ser homogénea en su respuesta a los herbicidas, tomándose como criterio de diversidad de la población de una cepa distintos mutantes en relación con la sensibilidad a antibióticos.

4) El picloram y 3,6-D tuvieron distinto efecto en la

respiración de los rizobios no adaptados a los herbicidas, así - mientras el 3,6-D no afectó el consumo de oxígeno en presencia de manitol, el picloram lo estimuló claramente en todas las cepas.

5) El contenido de proteína y RNA celulares de Rhizobium spp. no resultaron afectados, o solo muy ligeramente en el caso - del RNA, en las condiciones de nuestro ensayo.

6) Ninguna de las cepas bajo ensayo fue capaz de utilizar estos herbicidas como fuente de carbono y energía. Además, estos herbicidas no parecen ser metabolizados por Rhizobium, como sugieren los resultados del consumo de oxígeno en presencia de manitol, por rizobios adaptados a los herbicidas.

7) Los efectos adversos producidos en los rizobios en relación con la simbiosis con las leguminosas parecen deberse a la toxicidad de estos compuestos en la planta mas que en el Rhizobium.

8) Desde el punto de vista agrícola, estos herbicidas no parecen ser perjudiciales a los rizobios en vida libre en el suelo, no impidiendo su crecimiento ni afectando su viabilidad, así como tampoco su capacidad de nodular las leguminosas; solo a causa de los residuos de herbicida, la eficacia de la fijación de  $N_2$  de la simbiosis Rhizobium-leguminosa podría verse disminuida. Por otra parte, no hemos detectado que estos herbicidas produzcan efectos mutagénicos en Rhizobium y así la resistencia a antibióticos no se vió alterada por ninguno de ellos. Además, la resistencia a antibióticos es un factor implicado en la supervivencia y competitividad de los rizobios en el suelo.

6. B I B L I O G R A F I A

- ABUEVA, A.A. (1970). The effect of 2,4-D on the growth of micro-organisms and on nitrogen metabolism in a derno-podzolic soil. *Khimiya sel'Khoz.* 8, 601-604. (Weed Abstr. 21, 1122).
- ABUEVA, A.A. y BAGAEV, V.B. (1975). The transformation of fertilizer nitrogen in a derno-podzolic soil under the influence of 2,4-D. *Izv. timiryazev. sel'-Khoz. Akad.* 2, 127-130. (Soils and Fert. 38, 4167).
- ALKEEM, M.I.H. (1970). Oxidation of inorganic nitrogen compounds. - *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21, 67-90.
- ALKEEM, M.I.H. y ALEXANDER, M. (1960). Nutrition and physiology of - *Nitrobacter agilis*. *Appl. Microbiol.* 8, 80-84.
- ALEXANDER, M. (1958). (Citado por Audus, 1964).
- ALEXANDER, M. (1965a). Most probable number method for microbial - populations. En *Methods of Soil Analysis, part.II* (Ed. C.A. - Black). *Agron. Monograph 9*. American Society of Agronomy, Madison, Wisc., 1467-1472.
- ALEXANDER, M. (1965b). Nitrification. En *Soil Nitrogen* (Eds. W.V. Bartholomew y F.E. Clark). *Agron. Monograph 10*. American Society of Agronomy, Madison, Wisc., 307-343.
- ALEXANDER, M. (1977). *Introduction to Soil Microbiology*. Jhon Wiley-Sons, New York.
- ALEXANDER, M. y CLARK, F.E. (1965). Nitrifying bacteria. En *Methods of Soil Analysis, part.II* (Ed. C.A. Black). *Agron. Monograph 9*. American Society of Agronomy, Madison, Wisc., 1477-1483.
- ALEXANDER, M., MARSHALL, K.C. y HIRSCH, P. (1960). Autotrophy and - heterotrophy in nitrification. *Proc. Comm.III*, 7th Intern.

Congr. Soil Sci., Madison, Wisc., 586-591.

ALFARO, A. (1974). Plaguicidas Agrícolas y su Aplicación. Monografía INIA 6. Ministerio de Agricultura, Madrid.

ALLISON, F.E. (1966). The fate of nitrogen applied to soil. *Advan. Agron.* 18, 219-258.

ALTOM, J.D. y STRITZKE, J.F. (1973). Degradation of dicamba, picloram and four phenoxy herbicides in soils. *Weed Sci.* 21, 556-560.

ANDERSON, J.R. (1978). Pesticide effects on non-target soil microorganisms. En *Pesticide Microbiology* (Eds. I.R. Hill and S.S.L. Wright). Academic Press, New York, 313-533.

ANDERSON, G.R. y BAKER, G.O. (1950). Some effects of 2,4-D in representative Idaho soils. *Agron. J.* 42, 456-558.

ARROYO, M. (1971). Ponencia, 1<sup>er</sup> Symposium Nacional de Herbicidas, Madrid, vol. II, 1-8.

ASHTON, F.M. y CRAFTS, A.S. (1973). *Mode of Action of Herbicides* - (Ed. John Wiley-Sons). A Wiley-Interscience Publication, New York.

AUDUS, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. En *The Physiology and Biochemistry of Herbicides* (Ed. L.J. Audus). Academic Press, London, 190-203.

AUDUS, L.J. (1970). The action of herbicides and pesticides on the microflora. *Meded. Fac. Landb Rijksuniv. Gent* 35, 465-492.

AUDUS, L.J. (1976). *Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology* (Ed. L.J. Audus). Academic Press, London.

AVROV, O.E., BELOUS, A.G., ZHURBINA, N.S. y ZAVERYUKHIN, V. I. (1968). The effect of various herbicides on nodule bacteria of soy-

beans. Khimiya sel'Khoz. 6, 767-768. (Weed Abstr. 19, 1358).

BAILLY, R. y DUBOIS, G. (1978). Index Phytosanitaire. A.C.T.A., Paris, 265-342.

BALICKA, N. (1969). The effect of herbicides on soil microflora. VI. The effect of pH on susceptibility of some bacteria to herbicides. Acta microbiol. pol. (ser. B) 1(18), 43-45. (Weed Abstr. 19, 1346).

BALICKA, N. y BILODUB-PANTERA, H. (1964). The influence of atrazine on some soil bacteria. Acta microbiol. pol. 13, 149-152.

BALICKA, N. y SCHIESZCZANSKI, J. (1969). The effect of herbicides on soil microflora. III. The effect of herbicides on ammonification and nitrification in the soil. Acta microbiol. pol. 1(18), 7-10.

BARTHA, R., LANZILOTTA, R.P. y PRAMER, D. (1967). Stability and effect of some pesticide in soil. Appl. Microbiol. 15(1), 67-75.

BAUR, J.R., BAKER, R.D., BOVEY, R.W. y SMITH, J.D. (1972). Concentration of picloram in the soil profile. Weed Sci. 20, 305-309.

BEZUGLOV, V.G., MINENKO, A.K. y SHELESTOV, E.P. (1973). The effect of dicamba, Tordon 22K and Lumeton on weed and soil microflora. Khimiya sel'Khoz. 11, 854-856. (Weed Abstr. 23, 2917).

BHUIYA, Z.H. y WALKER, N. (1977). Autotrophic nitrifying bacteria in acid tea soils for Bangladesh and Srilanka. J. appl. Bact. 42, 253-257.

BLACKMAN, G.E. (1945). (Citado por Corbett, 1974).

BOIKO, V.S., DEGTYAREVA, M.G. y KAZAKOVA, I.P. (1969). The effect of 2,4-D and simazine on the microflora and nutrient status of grey forest soils. Khimiya sel'Khoz. 7, 203-207. (Weed Abstr. 19, 899).

- BOMMER, D.F.R. (1976). Landbewirtschaftung im internationalen Vergleich. Chemie und Fortschritt, Schriftenreihe Verband der Chemischen Industrie, Heft 2, 3-13.
- BREAZEALE, F.N. y CAMPER, N.D. (1972). Effect of selected herbicides on bacterial growth rates. Appl. Microbiol. 23, 431-432.
- BREMNER, J.M. (1965). Inorganic forms of nitrogen. En Methods of Soil Analysis (Ed. C.A. Black). Agron. Monograph 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisc. 1179-1232.
- BRISOU, J. y VARGUES, H. (1962). Relations entre groupes physiologiques microbiens hétérotrophes et processus de nitrosation. - - Compt. Rend. Soc. Biol. 156, 1487-1489.
- BROCK, J.L. (1972). Effects of the herbicides trifluralin and carbetamide on nodulation and growth of legume seedlings. Weed Res. 12, 150-154.
- BROOKES, R.F. y LEAFE, E.L. (1963). Structure and plant growth-regulating. Activity of some 2-benzothiazolyloxyacetic acids and 2-oxobenzothiazolin-3-ylacetic acids. Nature (London) 198, 589-590.
- BROWN, J.G. y UPRICHARD, S.D. (1976). Control of problem weeds in cereals with 3,6-dichloropicolinic acid and mixtures with phenoxy herbicides. Proc. Br. Crop Protection Conf.. British Crop Protection Council, London, vol. I, 119-125.
- BUCHANAN, R.E. y GIBBONS, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.. Waverley Press Inc., Baltimore.
- BUNDY, L.G. y BREMNER, J.M. (1973). Inhibition of nitrification in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 396-398.
- BURNS, R.C. y HARDY, R.W.F. (1975). Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants. Springer-Verlag, New York.

- BURNSIDE, O.C., WICKS, G.A. y FENSTER, C.R. (1971). Dissipation of di camba, picloram and 2,3,6-TBA across Nebraska. Weed Sci. 19, - 323-325.
- CAMPBELL, N.E.R. y ALLEM, M.I.H. (1965a). The effect of 2-chloro-6(tri chloromethyl)pyridine on the chemoautotrophic metabolisms of ni trifying bacteria. I. Ammonia and hydroxylamine oxidation by Ni trosomonas. Antonie van Leeuwenhoek 31, 124-136.
- CAMPBELL, N.E.R. y ALLEM, M.I.H. (1965b). The effect of 2-chloro-6(tri chloromethyl)pyridine on the chemoautotrophic metabolisms of ni trifying bacteria. II. Nitrite oxidation by Nitrobacter. Antonie van Leeuwenhoek 31, 137-144.
- CAMUGLI, E.N. y GOMEZ ETCHART, O.E. (1974). Efectos de los herbicidas 2,4-DB, Brominal y Tordon sobre el "Rhizobium meliloti" D.. - Rev. Fac. Agronomía de la Plata L(1-2), 41-47.
- CARLYLE, R.E. y THORPE, J.D. (1947). Some effects of ammonium and sodium salts of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on legumes and the Rhizobium bacteria. J. Am. Soc. Agron. 39, 929-936.
- CASELEY, J.C. y LUCKWILL, L.C. (1965). The effect of some residual - herbicides on soil nitrifying bacteria. Long. Ashton Agr. Res. and Hort. Sta. Univ. Bristol. Ann. Rep. for 1964, 78-88.
- COARTNEY, J.S. (1977). Foliar and soil applied herbicides for the - control of multiflora rose. Proc. 30th Ann. Meeting of the Southern Weed Sci. Soc., 323-325.
- CORBETT, J.E. (1974). The Biochemical Mode of Action of Pesticides. A subsidiary of Harcourt-Jovanovich Publishers. Academic Press, London.
- CORKE, C.T. y THOMPSON, F.R. (1970). Effects of some phenylamida her- bicides and their degradation products on soil nitrification. -

Can. J. Microbiol. 16, 567-571.

CRAMER, H.H. (1967). Plant Protection and World Crop Production, -  
Leverkusen, Farben Fabriken Bayer.

CHANDRA, P. (1964). Herbicidal effects on certain soil microbial -  
activities in some brown soils of Saskatchewan. Weed Res. 4,  
54-63.

CHEN, L.G., SWITZER, C.M. y FLETCHER, R.A. (1972). Nucleic acid and  
protein changes induced by auxin like herbicides. Weed Sci. -  
20, 53-55.

CHEN, Y.M. y LIN, C.Y. (1977). Effect of Dow 290 on RNA syntesis in  
soybean hypocotyl. Taiwania 22, 73-79.

CHUNDEROVA, A.I. y ZUBETS, T.P. (1970). The effect of herbicides on  
nitrifying bacteria from dernopodzolic soils. Mikrobiologiya  
39, 887-891. (Weed Abstr. 20, 1858).

CHUNDEROVA, A.I., ZUBETS, T.P. y SOFINSKII, A.M. (1971). The effect  
of herbicides on the soil microflora with their systemic use  
in the crop rotation. Khimiya sel'Khoz. 9, 527-530. (Weed - -  
Abstr. 21, 3267).

DANCER, W.S., PETERSON, L.A. y CHESTERS, G. (1973). Ammonification -  
and nitrification of N as influenced by soil pH and previous  
N treatments. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 37, 67-69.

DAVIS, F.S., VILLARREAL, A., BAUR, J.R. y GOLDSTEIN, I.S. (1972). Her-  
bicidal concentration of picloram in cell culture and leaf -  
buds. Weed Sci. 20, 185-188.

DE, B.K. y MUKHOPADHYAY, S. (1971). Effect of MCPA and Stam F-34 on  
the occurrence of some nutritional groups of bacteria in the  
rice fields of West Bengal. Int. Rice Commn. Newsl. 20, 35-39.

- DEBONA, A.C. y AUDUS, L.J. (1970). Studies on the effects of herbicides on the soil nitrification. *Weed Res.* 10, 250-263.
- DEEPE, K. y ENGEL, H. (1960). Untersuchungen über die temperaturabhängigkeit der nitratbildung durch Nitrobacter winogradski Buch bei ungehemmten und gehemmten Wachstum. *Zentbl. Bakt. Parasitkade.* II. 113, 561-568.
- DESHMUKH, V.A. y SHRIKHANDE, J.G. (1974). Effect of pre- and post-emergence treatment of herbicides on soil microflora and two microbial processes. *J. Indian Soc. Soil Sci.* 22, 36-42.
- DESHMUKH, V.A. y SHRIKHANDE, J.G. (1975). Effect of some herbicides on ammonification and nitrification in soils. *Agriculture and Agro-Industries J.* 8, 9/10, 12-15.
- DICKENS, R. y FEARS, R.D. (1977). New herbicides and combinations for utility brush control. *Proc. 30th Ann. Meeting of the Southern Weed Sci. Soc.*, 308.
- DIXON, M. (1952). *Manometric Methods. As Applied to the Measurement of Cell Respiration and other Processes.* Cambridge University Press.
- DIXON, R.O.D. (1969). Rhizobia (with particular references to relationships with host plants). *Ann. Rev. Microbiol.* 23, 137-158.
- DOBEREINER, J. (1978). Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. *Basic Life Sci.* 10, 13-24.
- DOMMERGES, Y. y MANGENOT, F. (1970). *Ecologie Microbienne du Soil* (Eds. Masson et C<sup>ie</sup>). Paris.
- DOMSCH, K.H. (1972). Interactions of soil microbes and pesticides. *Symp. Biol. Hung.* 11, 337-347. (*Weed Abstr.* 23, 1914).
- DOMSCH, K.H. y PAUL, W. (1974). Simulation and experimental analysis

of the influence of herbicides on soil nitrification. Arch. -  
Microbiol. 97, 283-301.

DOXTADER, K.G. y ALEXANDER, M. (1966). Nitrification by heterotrophic soil microorganisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 30, 351-354.

DOUROS, J.D. (1956). (Citado por Audus, 1964).

DUBEY, H.D. (1969). Effect of picloram, diuron, ametryne and prometryne on nitrification in some tropical soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 33, 893-896.

DUBEY, H.D. y RODRIGUEZ, R.L. (1970). Effect of Dyrene and maneb on nitrification and ammonification and their degradation in tropical soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 34, 435-439.

DUBOS, R.J. (1946). Inhibition of bacterial growth by auxins. Proc. Soc. exp. Biol. 63, 317-319.

DULLAART, J., WIJFFELMAN, C.A. y HAVEMAN, J. (1971). Effect of indole acetic acid on the growth of Rhizobium in culture. Antoine van Leeuwenhoek 37, 219-224.

DUNIGAN, E.P., ALLEN, L.D. y FREY, J.P. (1970). Effects of selected herbicides on the nodulation of soybeans. La Agric. 13, 6-7.

EISINGER, W.R. y MORRE, D.J. (1971). Growth-regulating properties of picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid). Can. J. Bot. 49, 889-897.

FAO (1967). Symposium on Crop Losses, Roma.

FAO (1972). Production Yearbook 26, Roma.

FARMER, F.H. y RENOIT, R.E. (1965). The effect of simazine on nitrification. Bact. Proc. P. A. 17.

FISHER, D.J. (1976). Effects of some fungicides on Rhizobium trifolii

- lil and its symbiotic relationship with white clover. Pestic. Sci. 7, 10-18.
- FISHER, D.J., HAYES, A.L. y JONES, C.A. (1978). Effects of some surfactant fungicides on Rhizobium trifolii and its symbiotic relationship with white clover. Ann. Appl. Biol. 90, 73-84.
- FISHER, D.J., PICKARD, J.A. y MCKENCIE, C.M. (1979). Uptake of the systemic fungicide triadimefon by clover and its effect on symbiotic nitrogen fixation. Pestic. Sci. 10, 75-82.
- FISYUNOV, A.V. (1969). Effect of herbicides on nitrate content and nitrification in ordinary chernozem. Agrokimiya 2, 122-126.
- FLEIG, O. (1952). The persistence of 2,4-D in the soil with reference to microbial activity mobility and decomposition. Mitt. Biol. Zent. Anst. Berl. 74, 133-135. (Soils and Fertilizers 15, 1455).
- FLETCHER, W.W. (1956). Effect of hormone herbicides on the growth of Rhizobium trifolii. Nature (London) 177, 1244.
- FLETCHER, W.W. y RAYMOND, J.C. (1956). Toxicity and breakdown of -- "hormone herbicides". Nature (London) 178, 151-152.
- FLETCHER, W.W., DICKENSON, P.B. y RAYMOND, J.C. (1956). The effect of certain hormone herbicides on the growth and nodulation of - Trifolium repens sylvestre in aseptic culture. Phytion 7, 121-130.
- FLETCHER, W.W., DICKENSON, P.B., FORREST, J.D. y RAYMOND, J.C. (1957). The effect of soil-applications of certain substituted phenoxy-acetic and phenoxybutiric acids on the growth and nodulation of Trifolium repens sylvestre. Phytion 9, 41-46.
- FLETCHER, W.W., ALCORN, J.W.S. y RAYMOND, J.C. (1959). Gibberellic acid and nodulation of legumes. Nature (London) 184, 1576.

- FLETCHER, W.W. y ALCORN, J.W.S. (1958). The effect of traslocated herbicides on rhizobia and the nodulation of legumes. En Nutrition of the Legumes (Ed. E.G. Hallsworth). Butterwoths, London, 284-288.
- FOCHT, D.D. y VERSTRAETE, W. (1977). Biochemical ecology of nitrification and denitrification. En Advances in Microbial Ecology (Ed. M. Alexander). Plenum Press, New York, I, 135-214.
- FOY, C.L. y PENNER, D. (1965). Effect of inhibitors and herbicides on tricarboxylic acid cycle substrate oxidation by isolated cucumber mitochondria. Weeds 13, 226-231.
- FREDERICK, L.R. (1956). The formation of nitrate from ammonium nitrogen in soils. I. Effect of temperature. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 20, 496-500.
- FRIESEN, H.A. (1965). The movement and persistence of dicamba in soil. Weeds 13, 30-33.
- GANTZ, R.L. y LANING, E.R., Jr. (1963). Tordon for the control of woody rangeland species in the Western United States. Down to Earth 19, 10-13.
- GARCIA, M.M. y JORDAN, D.C. (1969). Action of 2,4-DB and dalapon on the symbiotic properties of Lotus corniculatus (Birdsfoot trefoil). Plant and Soil 30, 317-334.
- GAUR, A.C. y MISRA, K.C. (1972). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the growth of Rhizobium spp. in vitro. Indian J. Microbiol. 12, 45-46.
- GAUR, A.C. y MISRA, K.C. (1977). Effect of simazine, lindane and cerasan on soil respiration and nitrification rates. Plant and Soil 46, 5-15.
- GILLBERG, B.O. (1971). On the effects of some pesticides on Rhizo-

- bium and isolation of pesticide-resistant mutants. Arch. Microbiol. 75, 203-208.
- GIRAR, H. y ROUGIEUX, R. (1967). Techniques de Microbiologie Agricole (Ed. Dunod). Paris.
- GOA, J. (1953). A micro-biuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 218-222.
- GODE, P. y OVERBECK, S. (1972). Untersuchungen zur heterotrophen nitrifikation. Z. allg. Mikrobiol. 12, 567-574.
- GOLEBIEWSKA, J., KASZUBIAK, H. y PAJEWSKA, M. (1967). Adaptation of Rhizobium to thiuram. Acta microbiol. pol. 16, 153-158.
- GORING, C.A.I. (1970). Nutrient cycling implications of pesticides. Int. Symp. Pesticides in the Soil. East Lansing, 51-57.
- GORING, C.A.I., GRIFFITH, J.D., O'MELIA, F.C., SCOTT, H.H. y YOUNGSON, C.R. (1967). The effect of Tordon on microorganisms and soil biological processes. Down to Earth 22, 1-4.
- GOGUADZE, V.D., GOBRONIDZE, E.A. y GOGIYA, L.G. (1972). The residual effect of the herbicide Tordon 22K on the microflora and nutrient status of the soil. Subtrop. Kul'Tury 3, 157-159.
- GOURNAY, X.P. de (1976). Incidences du désherbage chimique sur l'alimentation. Le Désherbage Chimique, 18-30.
- GRAHAM, D.O. (1964). The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. gen. Microb. 35, 511-517.
- GRAHAM-BRYCE, I.J. (1976). Crop protection: present achievement and future challenge. Chemistry and Industry, 545-553.
- GRAPELLI, A. y ROSSI, W. (1979). Effects of herbicides on growth, -

- respiration and IAA biosynthesis in Arthrobacter sp.. Chemosphere 8, 377-382.
- GRAY, T.R.G. (1970). Microbial growth in soil. Int. Symp. Pesticides in the Soil, East Lansing, 36-41.
- GRECHIN, I.P. y CH'ENG, H.S. (1960). Influence of various concentrations of gaseous oxygen in the air of the soil on oxidation-reduction conditions. Soviet Soil Sci., 775-778.
- GREENLAND, D.J. (1958). Nitrate fluctuations in tropical soils. J. Agric. Sci. 50, 82-92.
- GROSSBARD, E. (1970). Effect of herbicides on the symbiotic relationship between Rhizobium trifolii and white clover. Occasional Symp. Br. Grassld Soc.: white clover research 6, 47-59.
- GROSSBARD, E. (1971). The effect of repeated field applications of carbon dioxide and mineralization of nitrogen in soil. Weed Res. 11, 263-275.
- GROSSBARD, E. (1975). The effect of some herbicides on Rhizobium trifolii and its symbiosis with Trifolium repens with special reference to the role of calcium. Soil Sci. Ann. 26, 117-130.
- GROSSBARD, E. (1976). Effects on the soil microflora. Herbicides: Physiology, Biochemistry, Ecology, part. II (Ed. L.J. Audus). - Academic Press, London, 99-147.
- GROSSBARD, E. y MARCH, J.A.P. (1974). The effect of several substituted urea herbicides on the soil microflora. Pestic. Sci. 5, 609-623.
- GROVER, R. (1967). Studies on the degradation of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid in soil. Weed Res. 7, 61-67.
- GROVER, R. (1972). Effect of picloram on some soil microbial acti-

- vities. Weed Res. 12, 112-114.
- HAMAKER, J.W., JOHNSTON, H., MARTIN, R.T. y REDEMANN, C.I. (1963). A picolinic acid derivate: a plant growth regulator. Science 141, 363.
- HAMAKER, J.W., GORING, C.A.I. y YOUNGSON, C.R. (1966). Sorption and leaching of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid in soils. Adv. Chem. Ser. 60, 23-37.
- HANCE, R.J. (1967). Decomposition of herbicides in the soil by non biological chemical processes. J. Sci. Food Agric. 18, 544-547.
- HANUS, F.J., MAIER, R.J. y EVANS, H.J. (1979). Autotrophic growth of H<sub>2</sub>-uptake-positive strains of Rhizobium japonicum in an atmosphere supplied with hydrogen gas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 76, 1788-1792.
- HARDIN, J.W., CHERRY, J.H., MORRE, D.J. y LEMBI, C.A. (1972). Enhancement of RNA polymerase activity by a factor released by auxin from plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3146-3150.
- HARDY, R.W.F. y HAVELKA, U.D. (1975). Nitrogen fixation research: a key to world food. Science 188, 633-643.
- HARRIGAN, W.F. y McCANCE, M.E. (1968). Métodos de Laboratorio en Microbiología. Editorial Academia, León.
- HAUKE-PACEWICZOWA, T. (1969). Influence of herbicide treatments on the symbiosis of leguminous plants with Rhizobium. Pam. Pulawski 37, 241-259.
- HAUKE-PACEWICZOWA, T. (1970). Effect of simazine residues in the soil on the symbiotic fixation of nitrogen by legumes. Meded. Fac. Landb. Rijksuniv. Gent. 35, 497-503.
- HAUKE-PACEWICZOWA, T. (1971). The effect of herbicides on the acti-

- vity of soil microflora. Pam. Pulawski 46, 5-48.
- HAUKE-PACEWICZOWA, T. y KROLOWA, M. (1968). The influence of MCPA - and ioxynil on the soil microflora of the oat rhizosphere. - Pam. Pulawski 31, 17-28.
- HERBERT, D., PHIPPS, P. J. y STRANGE, R. E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. En Methods in Microbiology, v. 5B (Ed. J. R. Norris y D. W. Ribbons). Academic Press, Inc. London, 308-328.
- HIRSCH, P., OVERREIN, L. y ALEXANDER, M. (1961). Formation of nitrite and nitrate by actinomycetes and fungi. J. Bacteriol. 82, 442-448.
- HOFFMAN-KAKOL, I. y KWARTA, H. (1972). Investigating the effect of MCPA on weeds, the yield of spring barley and the soil microflora. Zesz. nauk. Akad. Rolnicz. Szczecin 38, 105-116.
- HSU, J. C. y CAMPER, N. A. (1973). Pure culture studies of Erwinia carotovora with 3,5-diodo-4-hydroxybenzonitrile. Appl. Microbiol. 26, 814-819.
- ISHAQUE, M. y CORNFIELD, A. H. (1976). Evidence for heterotrophic nitrification in an acid Bangladesh soil lacking autotrophic nitrifying organisms. Trop. Agric. (Trinidad) 53, 157-160.
- JANSSON, S. (1958). Tracer studies on nitrogen transformations in soil with special attention to mineralisation-immobilisation relationships. Kungl. Lantbrukshogs Ann. 24, 101-361.
- JENSEN, H. L. (1969). The effect of some herbicides on root nodule bacteria. Tidskr. Plavl. 73, 309-317. (Weed Abstr. 21, 1357).
- JENSEN, H. L. y PETERSEN, H. L. (1952). Decomposition of hormone herbicide by bacteria. Acta Agric. Scand. 2, 215-231.
- JOHNEN, B. G., DREW, E. A. y CASTLE, D. L. (1979). Studies on the effect of pesticides on symbiotic nitrogen fixation. En Soil-Borne -

Plant Pathogens (Ed. B. Schippers y W. Gams). Academic Press, London.

JOHNSON, E.J. y COLMER, A.R. (1957). Relationship between magnesium and the physiological effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on Azotobacter vinelandii and Rhizobium meliloti. J. Bacteriol. 73, 139-143.

JORDAN, D.C. y GARCIA, M.M. (1969). Interactions between 2,4-DB and the root-nodule bacteria of Lotus corniculatus. Plant Soil 30, 360-372.

KAISER, P., POCHON, J.J. y CASSINI, R. (1970). Influence of triazine herbicides on soil microorganisms. Residue Rev. 32, 211-233.

KANWAR, J.S. (1975). Introductory remarks. Int. Workshop on Grain Legume, ICRISAT, V-VII.

KAPUSTA, G. y ROUWENHORST, D.L. (1973). Interaction of selected pesticides and Rhizobium japonicum in pure culture and under field conditions. Agron. J. 65, 112-115.

KASZUBIAK, H. (1966). The effect of herbicides on Rhizobium. I. Susceptibility of Rhizobium to herbicides. Acta microbiol. pol. 15, 357-364.

KASZUBIAK, H. (1968a). The effect of herbicides on Rhizobium. II. Adaptation of Rhizobium to Afalon, Aretit and Liro-Betarex. Acta microbiol. pol. 17, 41-50.

KASZUBIAK, H. (1968b). The effect of herbicides on Rhizobium. III. Influence of herbicides on mutation. Acta microbiol. pol. 17, 51-58.

KECSKES, M. (1972). A survey of herbicide sensitivity and resistance of rhizobia. Symp. Biol. Hung. 11: 405-415.

- KEFFORD, N.P. y CASO, O.H. (1966). Apotent auxin with a unique chemical structure 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic. Bot. Gaz. - 127, 159-163.
- KEITT, G.W. y BAKER, R.A. (1966). Auxin activity of substituted benzoic acid and their effect on polar auxin transport. Plant - Physiol. (Lancaster) 41, 1561-1569.
- KEYS, C.H. y FRIESEN, H.A. (1968). Persistence of picloram activity in soil. Weed Sci. 16, 341-343.
- KRASIL'nikov, N.A. (1967). Microbes and chemicals against pests. - Sel'Khoz. Biologiya 2, 857-865. (Weed Abstr. 17, 1929).
- KUDZIN, Yu K., FISYUNOV, A.V., CHERNYAVSKAYA, N.A. y MAKAROVA, A.Ya (1973). The change in the nitrate content of a typical chernozem soil under the influence of mineral fertilizers and pesticides. Dokl. Vses. Akad. sel'Khoz. Nauk. imeni V.I. Lenina 9, 13-15. (Weed Abstr. 23, 1691).
- KULINSKA, D. (1967). The effect of simazine on soil microorganisms. Roczn. Nauk. roln. (A) 93, 229-262. (Weed Abstr. 18, 980).
- LAMARTINERE, C.A., HART, L.T. y LARSON, A.D. (1969). Delayed lethal effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on bacteria. Bull. environ. Contam. Toxic. 4, 113-119.
- LANGE, R.T. (1961). Nodule bacteria associated with the indigenous leguminosae of South-Western Australia. J. gen. Microbiol. - 26, 351-359.
- LEAFE, E.L. (1964). 4-Chloro-2-oxobenzothiazolin-3-ylacetic acid. - A new plant growth substance herbicide. Proc. 7th Br. Weed - Control Conf. I, 32-37.
- LEES, H. y QUASTEL, J.H. (1946). Biochemistry of nitrification in soil. I. Kinetics of, and the effects of poisons on, soil ni-

trification as studied by a soil perfusion technique. J. Biochem. 40, 803-815.

- LEHRI, K.L. y PRASAD, S.N. (1976). In vitro inhibitory effect of some fungicides on Rhizobium spp. and Azotobacter chroococcum. - J. Ind. Soc. Soil Sci. 24, 214-216.
- LEWIS, R.F. y PRAMER, D. (1958). Isolation of Nitrosomonas in pure culture. J. Bacteriol. 76, 524-528.
- LEWIS, D.C. y STEFANSON, R.C. (1975). Effect of N-serve on nitrogen transformations and wheat yield in some Australian soils. Soil Sci. 119, 273-279.
- LIBBENGA, K.R. y BOGERS, R.J. (1974). Root nodule morphogenesis. En The Biology of Nitrogen Fixation (Ed. A. Quispel). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 430-473.
- LIEDERMAN, J., HINOJO, J.M. y FOGLIATA, F.A. (1971). Effect of different herbicides applied to sugarcane on urea nitrification. - Revta ind. agric. Tucuman 48, 7-14.
- MAKAWI, A.A.M y ABDEL-GHAFFAR, A.S. (1970). The effect of some pesticides on the growth of root-nodule bacteria. J. Un. Arab. Rep. Microbiol. 5, 109-117.
- MAKAWI, A.A.M., MOUNIN, M.M. y HASSAN, M.S. (1971). The effect of simazine herbicide on weeds, germination and nodulation of Phaseolus vulgaris and on soil microorganisms. Libyan J. Sci. 1, 31.
- MALHOTRA, S.S. y HANSON, J.B. (1970). Picloram sensitivity and nucleic acids in plants. Weed Sci. 18, 1-4.
- MARSHALL, K.C. (1969). Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to rhizobia. J. gen. Microbiol. 56, 301-306.

- MARSHALL, K.C. y ALEXANDER, M. (1962). Nitrification by Aspergillus flavus. J. Bacteriol. 83, 572-578.
- MARTIN, H. (1972). Pesticide Manual, British Crop Protection Council.
- McLAREN, A.D. (1971). Kinetics of nitrification in soil: growth of the nitrifiers. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, 91-95.
- McLAREN, A.D. y ARDAKANI, M.S. (1972). Competition between species during nitrification in soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 36, -602-606.
- MEIKLE, R.W., YOUNGSON, C.R., HEDLUND, R.T., GORING, C.A.I. y ADDINGTON, W.W. (1974). Decomposition of picloram by soil microorganisms: a proposed reaction sequence. Weed Sci. 22, 263-268.
- MICKOVSKI, M.D. (1966). The influence of hormone herbicides upon the growth of some species of rhizobia as well as upon the germination and nodulation of Medicago sativa and Trifolium repens. Godisen Zb. zemjod.-sum. Fak. Univ. Skopje 19, 5-25.
- MOLBERG, E.S. (1965). Experiments with Tordon for weed control in flax. Down to Earth 20, 11-12.
- MOORE, T.C. (1979). Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag, New York.
- MOREL, J.L. (1977). Produits nouveaux: herbicides pour cèrèales, - mais, sorgho, lin et colza. Qu'est-ce que Lontrel?. Defense - des Vegetaux 188, 387-402.
- MORELAND, D.E. (1967). Mechanisms of action of herbicides. Ann. - Rev. Plant Physiol. 18, 365-386.
- MORRILL, L.G. y DAWSON, J.E. (1962). Growth rates of nitrifying chemototrophs in soil. J. Bacteriol. 83, 205-206.

- MURTY, B.R. (1975). Biology of adaptation in chickpea. Int. Workshop on Grain Legume, ICRISAT, 239-251.
- MUZIK, T.J. y GARCIA-BAUDIN, J.M. (1971). Herbicidas y fitohormonas. Bol. A.N.I.A. 219, 655-725.
- NAIK, M.N., JACKSON, R.B., STOKES, J. y SWABY, R.J. (1972). Microbial degradation and phytotoxicity of picloram and other substituted pyridines. Soil Biol. Biochem. 4, 313-323.
- NAISH, R.W. (1975). Dowco 290 - A new growth regulator herbicide. Proc. 28th N. Z. Weed and Pest Control Conf., 177-180.
- NALEWAJA, J.D. (1970). Reaction of wheat to picloram. Weed Sci. 18, 276-278.
- NAMDEO, K.N. y DUBE, J.N. (1973). Herbicidal influence on growth - sensitivity and mutagenic transformation in rhizobia. Indian J. exptl. Biol. 11, 114-116.
- NORRIS, D.O. (1965). Acid production by Rhizobium. A unifying concept. Plant Soil 22, 143-166.
- OBATON, M., AMARGER, N. y ALEXANDER, M. (1968). Heterotrophic nitrification by Pseudomonas aeruginosa. Arch. Mikrobiol. 63, - - 122-132.
- OGUR, M. y ROSEN, G. (1950). The nucleic acids of plant tissues. - I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. 25, 262-276.
- OTTEN, R.T., DAWSON, J.E. y SCHREIBER, M.M. (1957). The effects of - several herbicides on nitrification in soil. Proc. 11th N. E. - ast Weed Control Conf. 11, 120-127.
- PAINTER, H.W. (1970). A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. Water Res. 4, 393-450.

- PEARCE, J.L. (1958). (Citado por Audus, 1964).
- PETERS, E.J. y BEN ZBIBA, M. (1979). Effect of herbicides on nitrogen fixation of alfalfa (Medicago sativa) and red clover (Trifolium pratense). *Weed Sci.* 27, 18-21.
- PIK, A.J., PEAKE, E., STROSHER, M.T. y HODGSON, G.W. (1977). Fate of 3,6-dichloropicolinic acid in soils. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1054-1061.
- PLAMADEALA, B. (1972). Effects of certain herbicides on the fungi Rhizoctonia solani K nn, Alternaria sp. and Fusarium sp.. *Anst. Cercet. pent. Cult. Cart. Sfec. zahar. Brasov* 3, 365-372. (Weed Abstr. 24, 817).
- PORTER, W.L. y THIMANN, K.V. (1965). (Citado por Corbett, 1974).
- PRASAD, R., RAJALE, G.B. y LAKHDIVE, B.A. (1971). Nitrification retarders and slow release nitrogen fertilizers. *Advan. Agron.* 23, 337-383.
- QUASTEL, J.H. y SCHOLEFIELD, P.G. (1951). Biochemistry of nitrification in soil. *Bacteriol. Rev.* 15, 1-53.
- RAGAB, M.T.H. (1975). Residues of picloram in soil and their effects on crops. *Can. J. Soil Sci.* 55, 55-59.
- RANSEY, J.C. (1967). Tordon. En *Additional Principles and Methods of Analysis* (Ed. Gunter Zweig). Academic Press, New York, 507-525.
- RATNAWEERA, M. (1973). (Citado por Grossbard, 1976).
- RATNAYAKE, M. y AUDUS, L.J. (1978). Studies of the effects of herbicides on soil nitrification II. *Pestic. Biochem. and Physiology* 8, 170-185.
- REDEMANN, C.T., MEIKLE, R.W., HAMILTON, P., BANKS, V.S. y YOUNGSON, C.

- R.(1968). The fate of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid in spring wheat and soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 3, 80-96.
- ROBERTS, E.H.(1975). Crop protection: future demands of world agriculture. *Proc. 8th Br. Insecticide and Fungicide Conf.*, Brighton, 891-899.
- ROBINSON, A.C.(1967). The influence of host on soil and rhizosphere populations of clover and lucerne root nodule bacteria in the field. *J. Australian Inst. Agri Sci.* 33, 207-209.
- ROVIRA, A.D.(1961). Rhizobium numbers in the rhizospheres of red clover and Paspalum in relation to soil treatment and the numbers of bacteria and fungi. *Agri. Res.* 12, 77-83.
- SAIVE, R.(1974). Action of pesticides on soil micro-organisms. - - *Ann. Gembloux* 80, 55-70.
- SAXENA, M.C. y YADAV, D.S.(1975). Some agronomic consideration of pigeonpeas and chickpeas. *Int. Workshop on Grain Legume ICRI-SAT*, 31-59.
- SCHREVEN, D.A.van, LINDENBERGH, D.J. y KORIDON, A.(1970). Effect of several herbicides on bacterial populations and activity and the persistence of these herbicides in soil. *Plant Soil* 33, 513-532.
- SCHRODER, J., MEYER, M. y MUCKE, D.(1970). Die wirkung der herbicide 2,4-D, amitrol, atrazin, chlorpropham und chlorflurenol auf die nucleinsäure-biosynthese des ascomyceten Neurospora crassa. *Weed Res.* 10, 172-177.
- SCHWINGHAMER, E.A., EVANS, H.J. y DAWSON, V.D.(1970). Evaluation of effectiveness in mutant strains of Rhizobium by acetylene reduction relative to other criteria of N<sub>2</sub> fixation. *Plant Soil* 33, 192-212.

- SCIFRES, C.J., MUTZ, J.L. y STEGER, R.E. (1977). Ecology and control of bitterweed with herbicides. Proc. 30th Ann. Meeting of the Southern Weed Sci., 210.
- SHANNON, J.C., HANSON, J.B. y WILSON, C.M. (1964). Ribonuclease levels in mesocotyl tissue of Zea mays as a function of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid application. Plant Physiol. 39, - 804-809.
- SHATTUCK, G.E. y ALEXANDER, M. (1963). A differential inhibitor of nitrifying micro-organisms. Proc. Soil Sci. Soc. Am. 27, - - 600-601.
- SINGH, K. (1971). The effect of 2,4-D and simazine on total bacteria, fungi, Azotobacter, ammonification and nitrification - under field conditions. Pestic. Indian 6, 14-17. (Weed Abstr. 21, 3275).
- SKINNER, F.A. y WALKER, N. (1961). Growth of Nitrosomonas europaea in bath and continuous culture. Arch. Mikrobiol. 38, 339-349.
- SLEPECKY, R.A. y BECK, J.V. (1950). The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on nitrification in soil. Proc. Am. Soc. - Bact. 50, 17-18.
- SMITH, J.E. y SHENNAN, J.L. (1966). The effect of substituted phenoxyacetic and phenoxybutyric acids on the growth and respiration of Aspergillus niger. J. gen. Microbiol. 42, 293-300.
- SMITH, M.S. y WEEVARATNA, C.S. (1974). The influence of some biologically active compounds on microbial activity and on the availability of plant nutrients in soils. I. Simazine, ioxy nil and 2,3,6-TBA. Pestic. Sci. 5, 721-729.
- SOMMER, K. (1970). Effect of different pesticides on nitrification and nitrogen metabolism in soils. Sonderh. Landw. Fors-

ch. 25, 22-30.

- STANIER, R.Y., ADELBERG, E.A. y INGRAHAM, J.L. (1976). The Microbial World. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- STANSFIELD, J.R. (1974). Fuel in british agriculture. Rep. Nat. - Inst. Agric. Eng. Silsoe 13, 5.
- SUD, R.K., KUMAR, P. y GUPTA, K.G. (1973). On the effect of two herbicides on micro- and macro-symbionts. Zbl. Bakt. Abt. II., - 128, 423-425.
- SZYBALSKY, W. y BRYSON, V. (1952). Genetic studies on microbial - - cross resistance of Escherichia coli to fifteen antibiotics. J. Bacteriol. 64, 489-499.
- TEATER, R.W., MORTENSEN, J.L. y PRATT, P.F. (1958). Effect of certain herbicides on rate of nitrification and CO<sub>2</sub> evolution. J. Agric. Food Chem. 6, 214-216.
- THIMANN, K.V. (1969). The auxins. En The Physiology of Plant Growth and Development (Ed. M.B. Wilkins). McGraw-Hill, London, 1-45.
- THORNEBURG, R.P. y TWEEDY, J.A. (1973). A rapid procedure to evaluate the effect of pesticides on nitrification. Weed Sci. 21, - 397-399.
- TORSTENSSON, L. (1974). Effects of MCPA, 2,4,5-T, linuron and simazine on some functional groups of soil microorganisms. Swedish J. agric. Res. 4, 151-160.
- TORSTENSSON, L. (1975). Effects of bentazon and dinoseb on soil microorganisms and on the Rhizobium-Leguminosae symbiosis. Swedish agric. Res. 5, 177-183.
- TU, C.M. y BOLLEN, W.B. (1969). Effect of Tordon herbicides on microbial activities in three Willamette Valley soils. Down to - -

Barth 25, 15-17.

- TYAGNY-RYADNO, M.G. (1967). Effect of herbicides on the microflora and agrochemical properties of the soil. Trudy Kamenets-podolsk. sel'Khoz. Inst. 9, 43-48. (Weed Abstr. 18, 1440).
- TYLER, K.B. y BROADBENT, F.E. (1960). Nitrite transformations in California soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 24, 279-282.
- VALLEE, J.C., MARTIN, C. y VANSUYT, G. (1975). Conséquence de la persistance de certains herbicides dans les pailles. Compt. Rend. 8ème Conférence du Columa 4, 976-983.
- VANDEN BORN, W.H. (1969). Picloram residues and crop production. - Can. J. Plant. Sci. 49, 628-629.
- VANDERBORGHT, J.P. y BILLEN, G. (1975). Vertical distribution of nitrate concentration in interstitial water of marine sediments with nitrification and denitrification. Limnol. Oceanogr. 20, 953-961.
- VASIL'CHENKO, V.F., ABRAMOVA, K.A., DUBROVSKAYA, A.A., IL'NITSKAYA, L.P. (1975). The decomposition of picloram by micro-organisms and the phytotoxicity of picloram metabolites. En materialy 10 Mezhdunarodnogo Simp. Strau-Chelenov S.E.U Pushchino SSSR, vol. 2 34-36. (Weed Abst. 27, 835).
- VERSTRAETE, W. y ALEXANDER, M. (1972). Heterotrophic nitrification by Arthrobacter sp.. J. Bacteriol. 110, 955-961.
- VIETS, F.G., Jr. (1965). The plant's need for and use of nitrogen. En Soil Nitrogen (Eds. W.V. Bartholomew y F.E. Clark). American Society of Agronomy, Madison, Wisc., 503-549.
- VINCENT, J.M. (1970). A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. International Biological Program, Handbook 15. -- Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- VINCENT, J.M. (1977). Rhizobium: General microbiology. En A Treatise on Dinitrogen Fixation (Eds. R.W.F. Hardy y W.S. Silver). - John Wiley-Sons, New York, 277-365.
- VINTIKOVA, H., SKRDLETA, V. y SROGL, M. (1965). The sensitivity of nodule bacteria to several herbicides. Proc. Symp. Relationships between Soil, Micro-organisms and Plant Roots, 1963. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science, Prague, 264-268.
- VLASSAK, K. (1975). Effects of some pesticides on biological nitrogen fixation and on mineralization of nitrogen in soil. Soil Sci. Ann. 26, 191-200.
- VLASSAK, K. y LIVENS, J. (1975). Effect of some pesticides on nitrogen transformations in soil. Science Total Environ. 3, 363-372.
- WALKER, N. y WICKRAMASINGHE, K.N. (1979). Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in acid tea soils. Soil Biol. Biochem. 11, 231-236.
- WEBER, D.F. y GAINNEY, P.L. (1962). Relative sensitivity of nitrifying organisms to hydrogen ions in soils and solutions. Soil Sci. 94, 138-145.
- WEHR, N.B. y KLEIN, D.A. (1971). Herbicide effects on Bdellovibrio bacteriovorus parasitism of a soil pseudomonad. Soil Biol. Biochem. 3, 143-149.
- WEST, S.H., HANSON, J.B. y KEY, J.L. (1960). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the nucleic acid and protein content of seedling tissues. Weeds 8, 333-340.
- WINELY, C.L. y San CLEMENTE, C.L. (1970). Effects of pesticides on nitrite oxidation by Nitrobacter agilis. Appl. Microbiol. 19 - 214-219.

- WINELY, C.L. y San CLEMENTE, C.L. (1971). The effect of two herbicides (CIPC and eptam) on oxidative phosphorylation by Nitrobacter agilis. Can. J. Microbiol. 17, 47-51.
- WHITWORTH, J.W., GARNER, W. y WILLIAMS, B.C. (1965). The influence of herbicides on soil metabolism. Res. Prog. Rept. West. Weed Contr. Conf., 117-118.
- WITZEL, K.P. y OVERBECK, H.J. (1979). Heterotrophic nitrification by Arthrobacter sp. (Strain 9006) as influenced by different cultural conditions, growth state and acetate metabolism. Arch. - Microbiol. 122, 137-143.
- YOUNGSON, C.R., GORING, C.A.I., MEIKLE, R.W., SCOTT, H.H. and GRIFFITH, J.D. (1967). Factors influencing the decomposition of Tordon - herbicide in soils. Down to Earth 23, 2-11.
- ZAVARIN, V.I. (1966). The effect of herbicides on some agro-chemical properties. Agrokimiya 4, 121-124.

## 7. A P E N D I C E

### 1. Medios

#### 1.1. Solución salina de Winogradsky

Fosfato bipotásico .....	5,0 g
Sulfato magnésico .....	2,5 g
Cloruro sódico .....	2,5 g
Sulfato férrico .....	0,05 g
Sulfato manganeso .....	0,05 g
Agua destilada .....	1 litro

Se ajusta el pH a 7-7,5 con KOH

#### 1.2. Medio de Winogradsky para microorganismos nitrosantes

Sulfato amónico .....	0,5 g
Carbonato cálcico .....	0,5 g
Solución salina (apen. 1.1) .....	50 ml
Agua destilada .....	950 ml

Se esteriliza a 121<sup>o</sup>C durante veinte minutos

#### 1.3. Medio de Winogradsky para microorganismos nitratantes

Nitrito sódico .....	1 g
Carbonato cálcico .....	1 g
Solución salina (apen. 1.1) .....	50 ml
Agua destilada .....	950 ml

Se esteriliza a 121<sup>o</sup>C durante veinte minutos

#### 1.4. Medio de Skinner-Walker para Nitrosomonas

Sulfato amónico .....	0,5 g
Fosfato monopotásico .....	0,2 g
Cloruro cálcico .....	0,04 g

Citrato férrico .....	0,5 mg de Fe
Rojo fenol .....	0,5 mg
Agua destilada .....	1 litro

Después de la esterilización a 121°C durante veinte minutos el pH del medio se llevó a 7,5-8,0 por adición de solución acuosa estéril de carbonato cálcico al 5%

1. 5. Medio B para Nitrobacter agilis, ATCC (n° 96)

Nitrito sódico .....	1 g
Fosfato bipotásico .....	0,5 g
Cloruro sódico .....	0,3 g
Sulfato magnésico .....	0,5 g
Sulfato manganoso .....	2 mg
Sulfato férrico .....	5 mg
Agua destilada .....	1 litro

pH = 7,5

Se esteriliza a 121°C durante veinte minutos. Por cada 100 ml se añaden asépticamente 0,1 g de carbonato cálcico previamente esterilizado por calor seco a 160°C durante una hora

1. 6. Medio Extracto de levadura-Manitol para Rhizobium

Fosfato bipotásico .....	0,5 g
Cloruro sódico .....	0,1 g
Sulfato magnésico .....	0,2 g
Manitol .....	1,0 g
Extracto de levadura, Oxoid .....	0,4 g
Agua destilada .....	1 litro

El pH se ajusta según convenga con Cl H, 0,1 N

Este medio puede ser utilizado como medio sólido, añadiendo 1,2% (p/v) de agar Oxoid. La esterilización se realiza a 121°C durante veinte minutos

1.7. Medio Rh<sub>6</sub> para Rhizobium

Fosfato bipotásico .....	0,5 g
Cloruro sódico .....	0,1 g
Sulfato magnésico (SO <sub>4</sub> Mg-7H <sub>2</sub> O) .....	0,2 g
Glutamato sódico .....	1,1 g
Manitol .....	5 g
Agua levadura .....	100 ml
Agua destilada .....	900 ml

El pH se ajustó según conveniencia con Cl H 0,1 N

Rh<sub>6</sub> - Agar: Al medio anterior se le añadió agar, Oxoid al 1,2% (p/v)

La esterilización se realiza a 121°C durante veinte minutos

1.8. Solución de Oligoelementos de Gibbson

Bo .....	0,05%
Mn .....	0,05%
Zn .....	0,005%
Mo .....	0,005%
Cu .....	0,002%

El porcentaje viene dado en peso/volumen

1.9. Medio definido para Rhizobium

Fosfato dipotásico .....	1 g
Fosfato monopotásico .....	1 g
Tricloruro de hierro (Cl <sub>3</sub> Fe. 6H <sub>2</sub> O) .....	0,01 g

Sulfato magnésico ( $\text{SO}_4\text{Mg. } 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,25 g
Cloruro cálcico ( $\text{Cl}_2\text{Ca. } 6\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,1 g
Nitrato potásico .....	0,6 g
Manitol .....	10 g
Oligoelementos de Gibbson (apen. 1.8) .....	1 ml
Vitaminas 1) .....	50 mg
Agua destilada .....	1 litro

1) Las vitaminas suplementadas fueron biotina, tiamina y ac. pantoténico en la cantidad indicada.

El pH se ajustó a 6,8.

Se esterilizaron los fosfatos separadamente del resto del medio, a  $120^\circ\text{C}$  durante veinte minutos.

Las vitaminas fueron esterilizadas y añadidas aseptícamente por filtración.

1.10. Medio nutritivo, libre de nitrógeno de Jensen para plantas

Fosfato monocálcico .....	1 g
Fosfato bipotásico .....	0,2 g
Sulfato magnésico ( $\text{SO}_4\text{Mg. } 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	0,2 g
Cloruro sódico .....	0,2 g
Citrato férrico .....	0,29 g
Oligoelementos de Gibbson (apen. 1.8) .....	1 ml
Agua destilada .....	1 litro

Se ajusta el pH a 6,5 - 7 según convenga, y se esteriliza a  $121^\circ\text{C}$  durante veinte minutos, excepto cuando es añadido a macetas con vermiculita, caso en que el tiempo de esterilización del conjunto se prolonga a dos horas

1.11. Leche tornasolada

Se utiliza leche descremada reconstituida a la que se añade la cantidad de solución de tornasol suficiente para que tome color malva (10 ml de solución de tornasol al 4% por litro de leche). Se esteriliza en autoclave a 121°C durante tres minutos seguido de tratamiento en corriente de vapor durante treinta minutos tres días consecutivos. Antes de su utilización se incuba el medio dos días a 37°C y otros dos a 30°C.

1.12. Solución de Ringer al cuarto

Cloruro sódico .....	0,9 g
Cloruro potásico .....	0,042 g
Cloruro cálcico hidratado .....	0,048 g
Bicarbonato sódico .....	0,02 g
Agua destilada .....	400 ml

Se esteriliza a 121°C durante veinte minutos.

1.13. Tampon Dixon

Fosfato dipotásico .....	11,4 g
Cloruro magnésico .....	0,5 g
Agua destilada .....	1 litro

La solución de fosfato se lleva a pH 7 con ClH. Se esterilizan por separado los dos componentes a 121°C durante veinte minutos.

2. Reactivos

2.1. Griess-Llosvay

- Reactivo de diazotación:

Disolver 0,5 g de ácido sulfanílico en 30 ml de ácido acético glacial. Añadir 100 ml de agua destilada y filtrar.

Este reactivo es estable durante un mes, conservado en refrigerador.

- Reactivo acomplejante:

Disolver 0,1 g de  $\alpha$ -naftilamina en 100 ml de agua destilada hirviendo. Después de enfriar, añadir 30 ml de ácido acético glacial y filtrar.

Esta solución debe ser utilizada dentro del periodo de una semana, conservada en refrigerador.

Los dos reactivos se mezclan a partes iguales inmediatamente antes de su utilización.

2.2. Acido fenoldisulfónico

Se añaden 25 g de fenol puro a 225 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  ( $d=1,84$ ) y se calienta en baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  durante seis horas.

2.3. Mezcla zinc-cobre-dióxido de manganeso

Zn en polvo .....	1 g
Cu en polvo .....	0,1 g
Dióxido de manganeso .....	1 g

2.4. Reactivo de Orcinol

Reactivo 1. Disolver 0,9 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 1 litro de  $\text{ClH}$  concentrado ( $d=1,186$ ). Se conserva indefinidamente.

Reactivo 2. Disolver 1 g de orcinol en 100 ml de agua destilada. Conservado a  $0^\circ\text{C}$  es estable durante algunas semanas.

Inmediatamente antes de su uso se añade un volumen de reactivo 2 a cuatro volúmenes de reactivo 1.

2.5. Reactivo de Benedict

Reactivo 1. Carbonato sódico .....	100 g
Citrato sódico .....	173 g
En cantidad suficiente de agua y menor de 900 ml.	

Reactivo 2. Sulfato cúprico ( $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) .....	17,3 g en
100 ml de agua destilada.	

Se añade el reactivo 2 al 1 completando con agua destilada hasta un litro. Se conserva en refrigerador.

Apéndice 3. Compuestos plaguicidas citados en el texto.

Nombre común	Nombre químico
<u>Herbicidas</u>	
Afalon	ver linurón
Aretit	Acetato de 2-sec-butil-4,6-dinitrofenilo
Asulam	Sulfanilcarbamato de metilo
Atrazina	2-Cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina
Carbetamida	D-N-etil-2-(fenilcarbamoiloxi)propionamida
Cloramben	Acido 3-amino-2,5-diclorobenzoico
Clorfenac	Acido 2,3,6-triclorofenilacético
Clorprofam ó CIPC	N-(3-clorofenil)carbamato de isopropilo
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
Dalapon	Acido 2,2-dicloropropiónico
2,4-DB	Acido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico
2,4-DEP	Fosfito de tri-2,4-diclorofenoxietilo ó Fosfito de di-2,4-diclorofenoxietilo
2,4-DES	Sulfato ácido de 2-(2,4-diclorofenoxi)etilo
Dicamba	Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
Diclorprop ó 2,4-DP	Acido 2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico
Dinoseb	2-(1-Metilpropil)-4,6-dinitrofenol
DNOC	2-Metil-4,6-dinitrofenol
Eptam ó EPTC	N,N-di-n-propiltiocarbamato de etilo
Erbon	2,2-Dicloropropionato de 2-(2,4,5-tricloro fenoxi)etilo
Fenoprop ó 2,4,5-TP	Acido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico
Ioxinil	4-Hidroxi-3,5-diyodobenzonitrilo
Linuron	N-(3,4-diclorofenil)-N-metoxi-N-metilurea
MCPA	Acido 4-cloro-2-metilfenoxiacético

MCPB 6 4-MCPB	Acido 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)butírico
Mecoprop 6 2,4-MCPP	Acido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico
Paraquat	Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo
PCP	Pentaclorofenol
Pyrazona	5-Amino-4-cloro-2-fenil-3-piridazona
Pyriclor	2,3,5-Tricloro-4-hidroxipiridina
Simazina	2-Cloro-4,6-dietilamino-s-triazina
2,4,5-T	Acido 2,4,5-triclorofenoxiacético
2,3,6-TBA	Acido 2,3,6-triclorobenzoico
TCA	Acido tricloroacético
Tricamba	Acido 2,3,6-tricloro-2-metoxibenzoico
Triclopyr	Acido ((3,5,6-tricloro-2-piridinil)oxi)acé tico
Trifluralina	2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-trifluorometil anilina

Fungicidas

Alk 3	Etoxilatos de alcohol primario (C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> )
Benomilo	N-(1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol)carba- mato de metilo
Fentin	Ph <sub>3</sub> SnOH
Tiuram	Disulfuro de bis-(dimetiltiocarbamoil)
Triadimeform	1-(4-clorofenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-tria- zol-1-ilo)butanona
Tridemorf	2,6-dimetil-4-tridecilmorfolina

---