Ciencia del Suelo 15: 108-110 1997

INFLUENCIA DE FUNGICIDAS SOBRE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* CD *IN VITRO* E INOCULADO A *SETARIA ITALICA* EN SUELO

C A DI CIOCCO[1], E RODRIGUEZ CACERES[2]

[1]Universidad Nacional de Luján CC 221 (6700) Luján, Pcia de Bs. As., Argentina.[2]IMYZA INTA CC 25 (1712). Castelar. Pcia de Bs. As., Argentina.

INFLUENCE OF FUNGICIDES ON *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* CD *IN VITRO* AND INOCULATED TO *SETARIA ITALICA* IN SOIL

The effect of fungicides tiram and mancozeb on both growth and nitrogenase activity *Azospirillum brasilense* Cd was studied in pure cultures. The association with foxtail millet (*Setaria italica*) *cv* Carapé and *Azospirillum brasilense* Cd in combination with tiram, captan and mancozeb was determined. The inhibition of bacterial growth was observed with ditiocarbamates mancozeb and tiram in concentration lower than 10 mg l^{-1}. The nitrogenase activity of cultures in presence of 10 mg l^{-1} mancozeb or 20 mg l^{-1} tiram was completely blocked after 48 h of growth. In growth chambers it was not observed interaction between *A. brasilense* inoculation and fungicides on shoot dry weight of *Setaria italica*. Inoculation with *A. brasilense* and soil fungicides treatment caused increases on foxtail millet shoot dry weight. The fungicide captan increased significantly the root dry weight.

Key words: *Azospirillum brasilense* Cd - Captan - Fungicides - Mancozeb - *Setaria italica* - Tiram

INTRODUCCION

Azospirillum brasilense es una bacteria que coloniza la raíz de numerosas plantas. Su número afecta la concentración de ácido indol acético y ácido indol butírico, así como la tasa de respiración de las raíces de las plantas (Okon, Labandera 1994). Estos procesos generan aumento en la absorción de agua y nutrientes, los cuales junto a la fijación biológica de nitrógeno elevan la productividad de las plantas de interés agronómico (Di Ciocco, Rodríguez Cáceres 1994). Sin embargo los resultados a campo obtenidos hasta el presente empleando *Azospirillum* como inoculante agrícola arrojaron resultados variables (Okon, Labandera 1994). Los plaguicidas podrían estar relacionados con la respuesta impredecible a la inoculación. Muchos pesticidas presentan efectos transitorios, tolerables o incluso pueden llegar a aumentar la fijación de nitrógeno (Alvarez, Sleiman 1983). Los fungicidas, serían los biocidas que más afectan los principales ciclos biogeoquímicos (Gallori *et al.* 1991).

Los ditiocarbamatos tiram y mancozeb y las ftalamidas sustituidas entre los que se encuentra el captan son los fungicidas de amplio uso que pudiendo alcanzar el suelo como terápicos de semillas o aplicados sobre cultivos podrían afectar el número y la actividad de *Azospirillum* y otras bacterias fijadoras de nitrógeno consideradas promotoras del crecimiento vegetal (Gallori 1991).

En este trabajo se evaluó el efecto de varios fungicidas sobre el crecimiento y la fijación biológica de nitrógeno medida por la actividad de la enzima nitrogenasa de *Azospirillum brasilense* Cd, in vitro e inoculado a moha de Hungría (*Setaria italica*), cultivar Carapé.

MATERIALES Y METODOS

Para evaluar el efecto de los fungicidas sobre el crecimiento de *Azospirillum brasilense* cepa Cd (Gallori *et al.* 1991) se cultivó la bacteria en medio líquido NFb con NH_4Cl (Döbereiner, Day 1976) en agitación mecánica a 200 rpm y a 30°C. Luego de 24 h se diluyó el cultivo hasta 0,12 de absorbancia (a 610 nm).

Este cultivo prosiguió su crecimiento 1,5 h más hasta una absorbancia de 0,15. Posteriormente se adicionaron los fungicidas tiram (grado técnico 98%) y mancozeb formulado al 80% a diferentes concentraciones y se distribuyeron los cultivos en tubos de ensayo con 6 ml. El crecimiento se determinó con lecturas de absorbancia a las 8 y 24 h en un espectrofotómetro Coleman Junior II. Se realizaron 3 ó 4 repeticiones por tratamiento. Para determinar la actividad de la enzima nitrogenasa se prepararon frascos tipo antibiótico de 10 ml conteniendo 5 ml de medio NFb semisólido sin N, a los que se le agregó tiram al 98% o mancozeb al 80% a diferentes concentraciones disueltos en etanol 96°. Cada frasco se sembró con 0,1 ml de un cultivo de la cepa Cd. Se incubaron a 37 °C por 24 y 48 h y luego se reemplazó el tapón de algodón por uno de goma. Se inyectó 1 ml de acetileno y se colocaron 1 h a 37°C (Hardy *et al.* 1968). Luego de la incubación se inyectó 0,5 ml a un cromatógrafo de fase gaseosa Perkin Elmer Sigma con detector de ionización de llama. Se efectuaron 5 repeticiones por tratamiento.

En el ensayo de macetas se usaron recipientes plásticos de 500 ml, conteniendo 400 g de suelo Argiudol típico serie Castelar (Castelar, pcia. de Bs As) tamizado con malla de 1 cm.

El suelo presentó las siguientes características: matéria orgánica (%): 2,19; relación C/N: 9,7; fósforo asimilable (ppm): 62,0; CE pasta sat (mS/cm): 0,31; pH en 1N KCl 1:2,5: 5,8.

Se emplearon fungicidas formulados comercialmente. El captan se usó como polvo conteniendo 80% de principio activo, tiram líquido al 36 % y mancozeb como polvo mojable al 80%. La cantidad de fungicida aplicada al suelo para cada producto corresponde a la concentración que inhibió la actividad nitrogenasa de la bacteria y que podría acumularse en el suelo, luego de varias aplicaciones. Los fungicidas captan o mancozeb disueltos en agua se aplicaron sobre la superficie del suelo de cada maceta a una dosis equivalente a 10 ppm de producto en el suelo y tiram

a 20 ppm. El 29 de julio de 1996 se sembraron 10 semillas de *S. italica* por maceta para dejar sólo 4 plantas luego de la emergencia, hasta su cosecha. Las plantas se mantuvieron en cámara iluminada y se inocularon en su base cuando tenían 2 hojas con 0,3 ml de la cepa Cd de *A. brasilense* que creció en medio NFb sin nitrógeno a 37°C durante 96 h, alcanzando 3×10^7 bacterias por ml. Posteriormente se reinoculó de igual forma con 0,7 ml planta^{-1} con $2,5 \times 10^9$ bacterias por ml. A las plantas que no correspondía inocular se les agregó inóculo autoclavado.

Se efectuaron 8 tratamientos: 1-testigo, 2-inoculado con *Azospirillum*, 3-captan, 4-tiram, 5-mancozeb, 6-*Azospirillum* y captan, 7-*Azospirillum* y tiram, 8-*Azospirillum* y mancozeb. Se realizaron 7 repeticiones por tratamiento, dispuestos en un diseño de bloques completos al azar. Se efectuó un análisis factorial para determinar la posible interacción fungicidas-inoculación. La cosecha se realizó a 39 días desde la siembra. Los vástagos y raíces se secaron y pesaron. Previamente las raíces se lavaron y se tomó una muestra compuesta de 1 g por tratamiento, se esterilizaron superficialmente con cloramina T al 2%, se picaron y se determinó el número de bacterias en medio NFb sin nitrógeno por el método del número más probable usando la tabla de Mc Grady (Cochran *et al.* 1950). En todos los ensayos se realizó el análisis de la varianza y la comparación de medias según la prueba de Tuckey para P>0,05).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los ditiocarbamatos mancozeb y tiram redujeron el crecimiento en medio líquido de la cepa Cd de *Azospirillum brasilense* a concentraciones inferiores a 10 mg l^{-1} durante 24 h de cultivo (Tabla 1). Gallori *et al.* (1991) observaron que que 10 mg l^{-1} de tiram bloquearon totalmente el crecimiento de la Cd en medio líquido durante 8 h.

El efecto tóxico del tiram en todas las concentraciones evaluadas y del mancozeb a 4 mg l^{-1} disminuyó al aumentar el tiempo de exposición de las células al producto. A esto puede contribuir la adquisición de resistencia y la degradación que sufren los compuestos por acción hidrolítica, cuya vida media varía de acuerdo a su estructura química.

La actividad reductora de acetileno (Tabla 2) de la cepa Cd en medio semisólido sin nitrógeno se anuló en presencia de mancozeb a 10 mg l^{-1} o expuesta a tiram a una concentración de 20 mg l^{-1} durante 24 h. A menores concentraciones la inhibición de la actividad nitrogenasa fue parcial. En el ensayo con suelo, no se observó interacción en la aplicación conjunta de los fungicidas estudiados con la inoculación de la cepa Cd de *A. brasilense*. En general tanto los fungicidas como la inoculación mejoraron el crecimiento del vástago del cultivar Carapé de *Setaria italica* en forma significativa (Tabla 3).

El tiram, y el mancozeb en cultivos puros interfirieron a bajas concentraciones el crecimiento y la actividad nitrogenasa de *Azospirillum*. Sin embargo, en suelo la aplicación de estos productos en dosis equivalentes a las aplicadas *in vitro*, no impidió que las plantas inoculadas y tratadas con los fungicidas tuvieran un número de bacterias por gramo de raíz fresca, similar a aquellas sólo inoculadas con *Azospirillum* (mayor a 10^4 células g^{-1}).

Tabla 1. Crecimiento de *A. brasilense* Cd en medio líquido con N en presencia de tiram o mancozeb (mg l^{-1}). Datos en absorbancia.

Tratamiento		Tiempo de crecimiento (h) 8	24
Testigo del tiram		0,69 a	0,79 a
Tiram	2	0,64 b	0,74 a
Tiram	5	0,59 b	0,72 b
Tiram	10	0,46 c	0,70 c
Testigo del mancozeb		0,63 a	0,79 a
Mancozeb	4	0,57 b	0,79 a
Mancozeb	8	0,20 b	0,21 b
Mancozeb	16	0,14 c	0,08 c
Mancozeb	24	0,10 c	0,07 c

Letras iguales en la misma columna para cada fungicida no difieren significativamente a P>0,05.

Tabla 2. Efecto del tiram o el mancozeb (mg l^{-1}) sobre la actividad nitrogenasa de *A. brasilense* Cd.

Tratamiento		Actividad reductora de acetileno (nmoles de C_2H_4 ml^{-1} de medio de cultivo) 24 h	48 h
Testigo del tiram		140 a	106 a
Tiram	5	126 a	47,4 b
Tiram	10	54,8 b	48 b
Tiram	20	0 c	0 c
Testigo del mancozeb		148 a	129 a b
Mancozeb	1	165 a	155 a
Mancozeb	5	41,7 b	84,5 b
Mancozeb	10	0 b	0 c

Letras iguales en la misma columna para cada fungicida no difieren significativamente a P>0,05.

Tabla 3. Efecto de la inoculación con A.brasilense o del fungicida sobre el peso seco del vástago y la raíz de Setaria italica, a 39 días desde su siembra.

Tratamiento	Vástago (g)	Raíz (g)
No inoculado	549 a	135 a
Inoculado con *Azospirillum*	630 b	149 a
Sin fungicida	494 a	139 a
Tiram	559 a	136 a
Mancozeb	597 a b	146 a b
Captan	708 b	147 b

Letras iguales en la misma columna para cada factor no difieren significativamente a P>0,05.

Diferencias entre resultados obtenidos *in vitro* con los hallados *in situ* también fueron advertidos por otros autores (Omar *et al.* 1992). En suelos normales la vida media del captan es de 2 a 3 días y para el tiram de 40 días (Sisler 1982). La degradación de estos productos posiblemente permitió que se redujera el tiempo de exposición de las células de *Azospirillum* a concentraciones de los fungicidas que podrían haberle resultado tóxicas. Otros factores como la heterogeneidad del ambiente edáfico, los procesos de adsorción que sufren los fungicidas sobre las partículas del suelo y la colonización bacteriana de la raíz pudieron favorecer la supervivencia bacteriana. Finalmente, la inoculación con *A. brasilense* ejerció un efecto benéfico sobre el desarrollo de *S. italica* independientemente de los fungicidas adicionados, los cuales no afectaron e incluso, como en el caso del captan, mejoró el crecimiento del vástago y la raíz de la moha.

AGRADECIMIENTOS

A E Catá y S Míguez, por su colaboración en los ensayos de macetas y en el procesamiento de las muestras. Se contó con el apoyo económico del Proyecto Contaminación de Suelos (INTA) y del Programa Ecología Terrestre del Dpto de Cs Básicas de la UNLu.

REFERENCIAS

Alvarez R Sleiman A. 1983. Efecto de algunos pesticidas sobre *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* en cultivo puro. Rev. Facultad de Agronomía. 4 (): 277-281

Cochran W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the Most Probable Number. Biometrics. 6: 105-116

Di Ciocco C A & Rodríguez Cáceres E A. 1994. Field inoculation of *Setaria italica* with *Azospirillum* spp. in Argentine Humid Pampas. Field Crops Research. 37: 253-257

Döbereiner J, Day J M. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sities. En: Newton W.E. y C.J. Nyman Eds Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press. Pullman pp 518-538.

Gallori E, Casalone E, Colella C M, Daly S & Polsinelli. 1991. M.1,8-Naphthalic anhydride antidote enhances the toxic effects of Captan and Thiram fungicides on *Azospirillum brasilense* cells. Res. Microbiol. 142: 1005-1012

Hardy R W F, Holsten R D, Jackson E K & Burns R C. 1968. The acetylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol.43: 1186-1207

Okon Y & Labandera-González C A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum:* and evaluation of 20 years worldwide inoculation. Soil. Biol. Biochem. 26: 1591-1601.

Omar M N A, Berge O, Hassanein, E E, Shalan S N. 1992. *In vitro* and *in situ* effects of herbicide Thiobencarb on rice-Azospirillum association Symbiosis. 13: 55-63.

Sisler H D. 1982. Biodegradation of agriculture fungicides. In: Biodegradation of pesticides. pgs 133-155. Matsumura F & Krishna Murti CR (Eds). Plenum Press. New York & London.