

# EFECTO DE DIFERENTES MEZCLAS DE HERBICIDAS SOBRE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE CIANOBACTERIAS EN UN SUELO DE EL SOMBRERO ESTADO GUÁRICO

*Effect of different herbicides mixes on the cyanobacteria population dynamic in a soil of El Sombrero, Guárico State*

Ojeda A.<sup>1</sup>, J. Rojas<sup>1</sup> y J. Aciego<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto de Edafología. Maracay, estado Aragua, Venezuela.

## Resumen

En un ensayo en macetas conducido bajo condiciones controladas de invernadero se comparó el efecto de tres mezclas de herbicidas: 1) paraquat + atrazina + aceite blanco + pendime-talin; 2) paraquat + aceite blanco + pendimetalin + cianazina y 3) paraquat + aceite blanco + atrazina + metolacloro, sobre la dinámica poblacional de las algas fijadoras de nitrógeno en un suelo de El Sombrero, estado Guárico, trabajado con mínima labranza durante tres años. Las dosis aplicadas fueron demasiado altas (700-2000 veces por encima de las dosis recomendadas para campo). En el experimento se encontró que las diferentes mezclas de herbicidas afectaron de manera diferente a las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno, siendo el tratamiento de paraquat + aceite blanco + atrazina + metolacloro el que ejerció mayor efecto negativo sobre la dinámica de poblaciones de las algas fijadoras de nitrógeno.

**Palabras claves:** Algas, cianobacterias, herbicidas, mínima la-

branza.

## Abstract

An experiment in pots was conducted under controlled greenhouse conditions in order to compare the effect of three mixes of herbicides: 1) paraquat + atrazine + white oil + pendimethalin; 2) paraquat + white oil + pendimethalin + cyanazine y 3) paraquat + white oil + atrazine + metholachlor, on the population dynamic of cyanobacteria or fixing nitrogen alga in a soil of El Sombrero (Guarico State) worked with minimum tillage during three years. The applied doses were too high (700-2000 times over recommended dose). It was founded that different herbicides mixtures affected in different manner to the fixing nitrogen alga populations, being the treatment with paraquat + white oil + atrazine + metholachlor had major detrimental effect over fixing nitrogen alga population dynamic.

**Key words:** Algae, cyanobacteria, herbicides, minimum tillage.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura en Venezuela se ha ido expandiendo hacia áreas con suelos de alta susceptibilidad a la erosión, donde las prácticas de labranza convencional y los agentes climáticos (lluvia y viento) conducen a una pérdida de suelo. Frente a esta problemática la labranza mínima representa una alternativa viable que minimizaría o evitaría estos problemas; sin embargo, con la reducción de la labranza surgen problemas con el manejo de las malezas, debiendo ser éstas controladas químicamente con herbicidas.

Se ha demostrado que los métodos químicos de control de malezas pueden afectar a las poblaciones de microorganismos que hacen vida en el suelo y a las cuales no va dirigido el control (Black, 1992). Generalmente se considera que los herbicidas aplicados en dosis normales no tienen mayor efecto sobre la cantidad total de microorganismos del suelo o sobre la mayoría de las actividades que ellos realizan (Camper *et al.*, 1973).

La influencia de los herbicidas sobre las actividades microbianas en el suelo ha sido evaluada en años recientes, utilizándose frecuentemente para ello a los microorganismos involucrados en el ciclo del nitrógeno, por su sensibilidad a

los distintos contaminantes ambientales (Ferrer *et al.*, 1986). Todas las prácticas agrícolas y de restauración que mejoran la productividad y estimulan el desarrollo de las plantas como los sistemas de labranza mínima, promueven el desarrollo de las poblaciones de algas e incrementan su participación en estos procesos restauradores (Shtina, 1992).

Una de las razones por las cuales las algas del suelo pueden ser afectadas por los herbicidas se debe a su carácter de organismos autotróficos (Wegener *et al.*, 1985; Shtina, 1992) y también porque ellas se desarrollan principalmente sobre la superficie del suelo, donde la exposición a los herbicidas es más probable (Wegener *et al.*, 1985). Aunque existe un gran número de trabajos sobre las transformaciones de los herbicidas por hongos y bacterias, las algas han sido grandemente ignoradas y esto es sorprendente en vista de sus afinidades fisiológicas con las plantas (Wright y Maule, 1982).

El crecimiento del alga *Chlorella pyrenoidosa* fue retardado por la aplicación de atrazina y se determinó que tiene mayor inhibición del crecimiento porque afecta la división celular; además, en algas unicelulares el contenido de clorofila y carotenoides también es afectado (Gonzalez-Murua *et al.*, 1985). Un marcado descenso en el crecimiento y la actividad metabólica de las algas *Chlorella pyrenoidosa* y *Chlorella vul-*

garis se observó cuando se trataron con paraquat; esta acción inhibitoria sobre el peso seco de cada una de las especies fue atribuida principalmente a su efecto de disminuir el crecimiento de la población, el cual redujo el número de células de los cultivos tratados (Ibrahim, 1990).

El aceite blanco (aceite mineral) después de entrar en el suelo es conducido a grandes distancias por el agua, contaminando grandes áreas; esta contaminación reduce la diversidad de especies, número y biomasa de algas (Kabirov y Minibayev, 1982). Con la aplicación de este aceite en el suelo, no se encontraron algas, solamente bacterias esparcidas sin formar colonias (Shtina *et al.*, 1985).

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes mezclas de paraquat, atrazina, cianazina, pendimetalin y metolacloro sobre la dinámica poblacional de las algas fijadoras de nitrógeno o cianobacterias de un suelo agrícola trabajado durante tres años con labranza mínima.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestras de suelo*

Las muestras de suelo se recolectaron desde la superficie hasta una profundidad de aproximadamente 20 cm, en una parcela de tres (3) hectáreas en la finca Las Guacamayas que había sido trabajada con labranza mínima durante tres años, ubicada a unos 30 km de El Sombrero, Edo. Guárico. Estas fueron tomadas en febrero de 1993 en forma aleatoria en toda el área, cuando el suelo no sustentaba cultivo alguno, sólo ganado en pastoreo con soca de maíz (*Zea mays* L.); para ello se utilizaron palines y palas y se colocaron las muestras en bolsas plásticas para transportarlas sin refrigeración, hasta el laboratorio de Biología de Suelo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela en Maracay Edo. Aragua, para ser dejadas bajo condiciones de refrigeración ( $\pm 4$  °C) hasta el momento de establecer el ensayo.

### *Análisis de suelo*

El análisis de las muestras de suelo se realizó en el Laboratorio General de Suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Se determinó porcentaje de arena, limo y arcilla por el método de Bouyoucos, pH en agua (1:1) por lectura directa en el potenciómetro, contenido de materia orgánica por el método de Walkey y Black, fósforo por el método de Bray-1, potasio, calcio y sodio intercambiables extraídos con acetato de amonio y conductividad eléctrica por medición directa en el conductímetro en pasta saturada (Gilbert de Brito *et al.* 1990). La densidad aparente fue medida en campo utilizando el método del hoyo y el contenido de humedad fue medido por el método gravimétrico.

### *Tratamientos*

Se aplicaron cuatro tratamientos, los cuales consistieron

en: T<sub>0</sub>: testigo absoluto (sin herbicidas, solamente agua destilada); T<sub>1</sub>: aplicación de la mezcla de paraquat + atrazina + aceite blanco + pendimetalin; T<sub>2</sub>: aplicación de la mezcla de paraquat + aceite blanco + pendimetalin + cianazina y T<sub>3</sub>: aplicación de la mezcla de paraquat + aceite blanco + atrazina + metolacloro. En el cuadro 1 se presentan las dosis de ingrediente activo de los herbicidas evaluados, las cuales fueron mayores que las dosis de ingrediente activo que se recomiendan normalmente para los sistemas de labranza mínima y que no se aplicarían a nivel de campo por ser muy elevadas. Se utilizaron estas dosis tan altas para determinar hasta que concentración pueden estos herbicidas afectar las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno en el suelo y durante cuanto tiempo ejercen su efecto.

**Cuadro 1.** Dosis de ingrediente activo de los herbicidas evaluados en cada tratamiento.

Herbicida	Tratamiento			
	T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>
	Dosis de Herbicida(ppm.maceta <sup>-1</sup> )			
Paraquat (Gramoxone)	-	242	242	242
Atrazina (Triazol)	-	1952	-	1115
Pendimetalin (Prowl 330E)	-	1600	1200	-
Metolacloro (Dual)	-	-	-	1745
Cianazina (Bladex)	-	-	1515	-
Aceite Blanco (Rocío Blanco)	-	1933	1933	1933

### *Muestreo del suelo en las unidades experimentales*

El primer muestreo de suelo para determinar las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno en las macetas se realizó al día siguiente de la aplicación de los tratamientos y se repitió cada quince días durante un período de tiempo de ciento veinte días. En cada muestreo se seleccionó aleatoriamente una maceta o unidad experimental de cada tratamiento. A lo largo del experimento se mantuvo constante el contenido de humedad en cada unidad experimental pesando diariamente cada envase, compensando la diferencia de peso con agua.

### *Cuantificación de microorganismos*

Para la cuantificación de las algas se utilizó la técnica del Número Más Probable (NMP); este método está basado en la teoría de las probabilidades y consiste en la determinación de la presencia o ausencia de un organismo de interés en algunas diluciones consecutivas de la muestra de suelo que está siendo evaluada (Alexander, 1982; Woomey *et al.*, 1988; Woomey, 1992). El medio de cultivo utilizado fue la solución de Chu (Shields, 1982) específico para algas fijadoras de nitrógeno, dispensada en tubos de ensayos y esterilizados en autoclave.

Los tubos de ensayo ya inoculados con las diluciones de suelo fueron dejados en incubación en un sitio con luz natural dentro del laboratorio y se evaluaron a los 28 días después de la inoculación, clasificándose como positivos aquellos tubos

que presentarán un halo verde o pardo (Harrigan y McCance, 1968). Los resultados se expresaron como unidades formando

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y 15 repeticiones en cada uno, para un total de 60 unidades experimentales. Los muestreos fueron al azar sin reposición, eliminándose la unidad experimental muestreada. A los resultados se les aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, la cual es equivalente al ANAVAR paramétrico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis de suelo

En el cuadro 2, se presenta el análisis del suelo de la parcela a la profundidad muestreada. Esta capa de suelo es de textura franco-limosa, con baja estabilidad estructural por lo que es susceptible a ser erosionada, pH ligeramente ácido, bajo contenido de materia orgánica y contenidos medios de fósforo, potasio y Ca. La densidad aparente medida en campo fue de  $1,5 \text{ Mg.m}^{-3}$  y el contenido de humedad gravimétrico fue de 14 % al momento del muestreo.

**Cuadro 2.** Análisis de suelo de la finca Las Guacamayas ubicada en El Sombrero estado Guárico.

Arcilla (%)	15,6
Limo (%)	58,0
Arena (%)	26,4
Textura	FL
pH 1:1 H <sub>2</sub> O	6,1
CE (dS.m <sup>-1</sup> )	0,093
MO (%)	1,33
P (ppm)	40
K (ppm)	74
Ca (ppm)	895
Na (ppm)	6
Da (Mg.m <sup>-3</sup> )	1,5

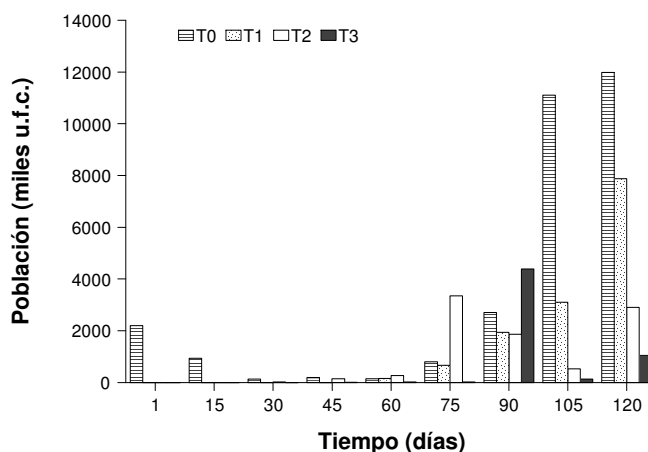
### Poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno

La tendencia observada en las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno a través del tiempo en el tratamiento testigo es de ir aumentando a partir del inicio del experimento, alcanzando sus mayores valores de población al final del mismo (Figura 1). Esto posiblemente es debido a que las algas se encontraban en estado de latencia o reposo esperando que se presentaran las condiciones de humedad requeridas para la germinación de sus esporas, ya que las muestras de suelo fueron colectadas en plena estación seca.

El comportamiento observado en este tratamiento testigo desde los 15 a los 75 días no es el esperado, lo que pudiera ser debido a la falta de dispersión de las células de ciano-

colonias (u.f.c.).

bacterias o ausencia de las mismas en la alícuota tomada de la dilución o estar influenciado por errores experimentales, tal como lo indicó Shields (1982), quien expresó que los errores en el conteo en dilución resultan de las fallas para obtener una dispersión uniforme de algas que forman masas gelatinosas.



**Figura 1.** Poblaciones medias de algas fijadoras de nitrógeno.

Con los herbicidas, en general se observó un efecto negativo sobre estas poblaciones. En los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub>, las poblaciones medias se vieron afectadas negativamente hasta los 15 días después de aplicados los mismos, aumentando lentamente a partir de los 75 días, luego disminuyen a los 90 días y aumentan nuevamente a los 105 días (Figura 1); lo esperado sería que al aumentar se mantuviera esta tendencia hasta el final del ensayo, si este aumento fuese debido a que otros organismos degradaron el producto o que ellas mismas lo hubiesen degradado, como lo reportan Wright y Maule (1982) quienes indicaron que algunas algas verdes y algas verde-azules (cianobacterias) pueden transformar algunos herbicidas tales como clorprophan y propanil, liberando compuestos que pueden ser menos tóxicos y menos dañinos a las algas que los compuestos originales

En el tratamiento T<sub>3</sub> la población media de algas fijadoras de nitrógeno comenzó a aumentar lentamente a partir de los 60 días, lo que hace suponer que ha disminuido el efecto tóxico de los herbicidas, disminuyendo a partir de los 120 días. Estos resultados concuerdan con lo expresado por Shtina *et al.*, (1985) quienes reportan que es bien conocido que las algas del suelo reaccionan a diferentes tipos de xenobióticos, especialmente los herbicidas, haciendo posible su uso como bioindicadoras del suelo.

El efecto inhibitorio de los herbicidas aplicados al suelo sobre el crecimiento y la actividad de las algas que hacen vida en este medio es obvio, dada su gran afinidad con las plantas superiores. Uno de los herbicidas que provoca mayor

inhibición del crecimiento es la atrazina porque afecta la división celular; además, en algas unicelulares también afecta el contenido de clorofila y carotenoides (González-Murua *et al.*, 1985).

Al realizar una prueba de rangos de Kruskal y Wallis a la variable dependiente algas fijadoras de nitrógeno, se establecieron comparaciones entre los rangos de las poblaciones de los diferentes tratamientos significativos a través del tiempo (Cuadro 3).

Comparando el tratamiento testigo con el tratamiento T<sub>1</sub> a los 1, 15 y 45 días, se observa que existieron diferencias estadísticas altamente significativas, donde el rango de población es mayor en el testigo que en el tratamiento T<sub>1</sub>; a partir de los 75 días después de aplicados los tratamientos no existieron diferencias estadísticamente significativas hasta el final del ensayo; sin embargo en la Figura 1 se observa claramente que las poblaciones de cianobacterias en el testigo son mayores que el en tratamiento 1. Esto indica que el tratamiento del suelo con paraquat + atrazina + aceite blanco + pendimetalin afectó severamente a las poblaciones de algas en los primeros 45 días después de aplicado el tratamiento, perdiendo su efecto nocivo a partir de los 60 días donde se observó que comenzó a aumentar la población de cianobacterias (Figura 1).

**Cuadro 3.** Prueba de rangos de Kruskal Wallis para poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno.

Tiempo (días)	A**	Diferencia de rango	B*	Diferencia de rango
1	T <sub>0</sub> - T <sub>1</sub>	11,88		
15	T <sub>0</sub> - T <sub>1</sub>	11,38		
	T <sub>0</sub> - T <sub>3</sub>	10,0		
30			T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	7,88
45	T <sub>0</sub> - T <sub>1</sub>	10,50		
60				
75			T <sub>2</sub> - T <sub>3</sub>	8,63
90				
105	T <sub>0</sub> - T <sub>3</sub>	11,00		
120	T <sub>0</sub> - T <sub>3</sub>	9,13		

\*Z<sub>tab</sub> = 2.39 (α = 0.10) Diferencias significativas; \*\*Z<sub>tab</sub> = 2.64 (α = 0.05) Diferencias altamente significativas; Comparaciones múltiples: La hipótesis nula es rechazada si Z<sub>calc</sub> es mayor que el valor crítico de Z<sub>tab</sub>. T<sub>0</sub> = tratamiento testigo; T<sub>1</sub> = tratamiento 1; T<sub>2</sub> = tratamiento 2; T<sub>3</sub> = tratamiento 3.

Comparando el testigo con el tratamiento T<sub>2</sub> se observa que no existieron diferencias estadísticamente significativas durante todo el ensayo; no obstante, la tendencia observada en la figura 1 es diferente, ya que las poblaciones en el testigo son mayores que en este tratamiento. Al comparar el testigo con el tratamiento T<sub>3</sub> a los 15, 105 y 120 días, la prueba de rangos múltiples arroja que existen diferencias altamente significativas, donde el rango de población es mayor en el testigo que en el tratamiento T<sub>3</sub>.

Al comparar los tratamientos con los herbicidas entre sí, entre T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> y T<sub>1</sub> y T<sub>3</sub> no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los rangos de población para di-

chos tratamientos durante todo el tiempo de evaluación.

Finalmente, al comparar T<sub>2</sub> con T<sub>3</sub> se observaron diferencias estadísticamente significativas a los 30 y 75 días después de aplicados los tratamientos, donde el rango de población en el tratamiento T<sub>2</sub> es mayor que el de T<sub>3</sub>. Por lo tanto, se puede afirmar que el tratamiento con paraquat + aceite blanco + pendimetalin + cianazina estadísticamente tuvo menor efecto nocivo sobre las algas fijadoras de nitrógeno a partir de los 30 días que el tratamiento con paraquat + aceite blanco + atrazina + metolacoloro. Aunque el metolacoloro es poco persistente en el suelo (aproximadamente 50 días) y es fácilmente degradado por los microorganismos del suelo (Zimdahl y Clark, 1982; Griffin y Robinson, 1989), poco se conoce sobre su efecto sobre las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno; por los resultados obtenidos se puede afirmar que produjo un efecto de magnificación de la toxicidad de los herbicidas sobre las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno, ya que el tratamiento donde este producto estaba mezclado tuvo el mayor efecto perjudicial sobre las poblaciones evaluadas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las poblaciones de algas fijadoras de nitrógeno se vieron afectadas negativamente por todos los tratamientos con herbicidas, siendo el tratamiento con paraquat + atrazina + metolacoloro + aceite blanco el que ejerció mayor efecto deletéreo sobre la dinámica de estas poblaciones. Esto posiblemente debido a la afinidad de las algas con las plantas superiores, pudiendo los herbicidas o la mezcla de ellos en este caso, afectar el crecimiento de estas poblaciones.

Las mezclas de herbicidas utilizadas fueron excesivamente altas en comparación a las que generalmente se recomiendan y utilizan bajo condiciones de campo. Sin embargo, el efecto tóxico sobre las algas fijadoras de nitrógeno desaparece con el tiempo, por lo que se esperaría que utilizando las dosis recomendadas comercialmente el efecto tóxico sobre las cianobacterias duraría menos tiempo y no representaría un problema grave de contaminación para estos organismos.

Las cianobacterias, por su sensibilidad a los herbicidas pueden ser utilizadas para evaluar la contaminación ambiental por estos agroquímicos.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Fundación Polar por el financiamiento de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

Alexander, M. 1982. Most Probable Number Methods for Microbial Populations. *In*. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Eds.), Methods of Soils Analyses, Part 2, 2<sup>nd</sup>. Ed. Chemical and Microbiology Properties. Agronomy N° 9.

- American Society of Agronomy Inc. Soil Science Society of America Inc. Madison, Wis. pp. 815-821.
- Black, B.** 1992. Interactions of weeds and aerial blight (*Rhizoctonia solani*) in soybean (*Glycine max*) and the influence of weed presence on disease development and control. Ph.D. Dissertation Research Proposal. Louisiana State University (USA): 29 p.
- Camper, N., E. Moherek, J. Huffman.** 1973. Changes in microbial populations in paraquat - treated soil. Weed Research 13:231-233.
- Ferrer, M., J. González-López, A. Ramos-Cormenzana.** 1986. Effect of some herbicides on the biological activity of *Azotobacter vinelandii*. Soil Biology and Biochemistry 18(2):237-238.
- Gilabert de Brito, J., I. Lopez de Rojas, R. Perez de Roberti.** 1990. Manual de referencia y procedimientos. Análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad. Versión preliminar. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Maracay, Edo. Aragua. 164 p.
- González-Murua, C., C. Muñoz-Rueda, F. Hernando, M. Sánchez-Díaz.** 1985. Effects of atrazine and methabenzthiazuron on oxygen evolution and cell growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Weed Research 25:61-66.
- Griffin, J., J. Robinson.** 1989. Metolachlor and alachlor persistence in rice (*Oryza sativa*) following soybean (*Glycine max*). Weed Technology 3:82-85.
- Harrigan, W., M. Mccance.** 1968. Métodos de Laboratorio en Microbiología. Ed. Academia León (España). 426 p.
- Ibrahim, E.** 1990. The influence of the herbicide paraquat "Gramoxone" on growth and metabolic activity of three chlorophytes. Water, Air and Soil Pollution 51:89-93.
- Kabirov, R., R. Minibayev.** 1982. Effect of oil on soil algae. Soviet Soil Science 14(1):49-54.
- Shields, L.** 1982. Algae. *In*. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney (Eds.), Methods of Soils Analyses, Part 2, 2<sup>nd</sup>. De. Chemical and Microbiology Properties. Agronomy Ser. N 9. American Society of Agronomy Inc. Soil Science Society of America Inc. Madison, WI. pp. 1103-1121.
- Shtina, E.** 1992. Regulation of the development of algae in soil. Eurasian Soil Science (2):79-88.
- Shtina, E., L. Neganova, T. Yel'shina, I. Shilova, M. Andronova.** 1985. Soil algae in polluted soil. Soviet Soil Science 17(6):18-26.
- Wegener, K., R. Aldag, B. Meyer.** 1985. Soil algae: effects of herbicides on growth and C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction (nitrogenase) activity. Soil Biology and Biochemistry 17(5):641-644.
- Woomer, P., P. Singleton, B. Bohlool .** 1988. Reliability of the most probable number technique for enumerating *Rhizobium* in tropical soils. Applied and Environmental Microbiology 54(6):1494-1497.
- Woomer, P.** 1992. Most Probable Number counts of *Rhizobium* in soils. *In*. J. Anderson and J. Ingram (Eds.). Tropical Soil Biology and Fertility. A Handbook of Methods, 2<sup>nd</sup> ed. CAB International. pp. 172-177.
- Wright, S., A. Maule.** 1982. Transformation of the herbicides propanil and chlorpropham by micro-algae. Pesticide Science 13:253-256.
- Zimdahl, R., S. Clark .** 1982. Degradation of three acetanilides herbicides in soil. Weed Science 30(5):545-548.