

## Tesis de Posgrado

# Acción de algunos herbicidas selectivos sobre microorganismos

Witt, Enrique Roberto

1953

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Witt, Enrique Roberto. (1953). Acción de algunos herbicidas selectivos sobre microorganismos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0772\\_Witt.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0772_Witt.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Witt, Enrique Roberto. "Acción de algunos herbicidas selectivos sobre microorganismos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1953.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0772\\_Witt.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0772_Witt.pdf)

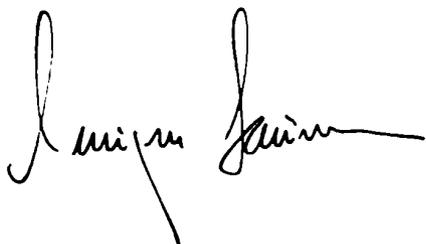
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

" ACCION DE ALGUNOS HERBICIDAS SELECTIVOS SOBRE  
MICROORGANISMOS "

por

ENRIQUE ROBERTO WITT



Tesis presentada para optar al  
título de Doctor en Química

- 1953 -

TESIS: 772

772-772

Dejo constancia de mi agradecimiento al Dr.  
D. Zappi, de "Laboratorios Dr. Zappi " y al Sr. J. del Blanco  
de " Williams, Industrial y Comercial " quienes pusieron a  
mi disposición los herbicidas usados en el presente trabajo;  
a la Dra. L. Pisarello y al personal de la Cátedra de Micro-  
biología por su asesoramiento en diversas fases del presente  
trabajo.

E. R. WITT

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

La lucha contra las plagas agrícolas se desarrolla con creciente vigor desde los albores mismos de la civilización; en muchos de sus aspectos ha sido el químico quien ha proporcionado las armas más exitosas y así lo ha sido en la lucha contra las malezas. El uso de agentes químicos en este sector de la agricultura comienza con el uso de tóxicos inorgánicos en el siglo pasado y culmina en el año 1942 con la introducción del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), primero y más difundido de un amplio grupo de herbicidas selectivos, que en estos pocos años han pasado de drogas casi desconocidas a productos de la industria pesada.

El comportamiento de estos herbicidas es muy parecido al de ciertas hormonas que se hallan normalmente en todos los vegetales; cabe preguntar entonces, si los microorganismos, cuyos mecanismos biológicos son afines a los de las plantas superiores son también afectados en igual medida por estos herbicidas; si así fuese, habría que esperar una alteración marcada de la microflora en los terrenos tratados, con consecuencias difíciles de prever. En el presente trabajo se realizaron ensayos con varios microorganismos a fin de determinar su grado de susceptibilidad a la acción del 2,4-D que es el más conocido de los herbicidas en uso. El plan de dicho trabajo es el siguiente:

- I) Reseña general de herbicidas
- II) Mecanismo de acción del 2,4-D y sus análogos
- III) Acción de los herbicidas selectivos sobre microorganismos
- IV) Parte experimental
- V) Conclusiones
- VI) Bibliografía

## I) HERBICIDAS ; RESEÑA GENERAL

Usaremos aquí la denominación poco feliz de " herbicida ", por ser la de uso generalizado; en efecto, suele ocurrir que lo que se desea destruir sea precisamente el material no herbáceo, tal como arbustos leñosos o aún árboles; en otros casos se desea una eliminación general de la vegetación existente. Sería mucho más correcto referirnos a estas sustancias denominándolas " fitocidas ", " fitotóxicos " o destructoras de malezas, entendiendo por malezas, los vegetales indeseables de cada caso particular. (32) Puede tratarse en un caso de plantas que crecen junto a especies cultivadas, restándoles espacio, agua y elementos nutrientes; en otro podrán ser arbustos que interfieren con el tendido de redes de cable, o podrá tratarse de plantas acuáticas que dificulten el movimiento del agua en canales, etc., en suma tendremos la más amplia gama de vegetales susceptibles de ser considerados como malezas.

Entre los diversos métodos usados para controlar malezas, nos referiremos tan solo al químico, el más importante en la actualidad. Las sustancias químicas usadas como herbicidas pueden ser clasificadas en dos grupos: herbicidas selectivos y no selectivos; la separación entre ambos grupos no es sin embargo neta. Los selectivos son sustancias orgánicas que ejercen su efecto en concentraciones muy pequeñas, son fácilmente absorbidos y transportados a través de todo el vegetal, cualquiera sea el punto de su aplicación, suelen diferir muchísimo en su grado de acción sobre diferentes especies vegetales y su toxicidad suele variar fundamentalmente con pequeños cambios en

su arquitectura molecular; además, a concentraciones subletales, sus efectos son muy parecidos a los que producen las fitohormonas naturales.

Los herbicidas no selectivos son generalmente sales o ácidos inorgánicos, y su acción se produce por hipertonicidad o por coagulación de protoplasma; su toxicidad es por lo tanto completamente general y la única manera de lograr una cierta selectividad es aplicándolos a plantas de tamaño o vigor muy diferente.

Haremos una breve reseña de ambos tipos de herbicidas.

HERBICIDAS NO SELECTIVOS: Los herbicidas de este tipo se conoce de antiguo; los más importantes son:

Compuestos del arsénico: se han usado desde mucho tiempo para la esterilización de suelos, generalmente en forma de anhídrido arsenioso  $As_2O_3$ , o más generalmente de arsenito de sodio  $AsO_2Na$  en solución acuosa; algunos compuestos orgánicos, tales como arsenofenonas, también se emplean; en general los compuestos del arsénico son fuertemente fijados por los coloides del suelo y su efectividad varía por lo tanto por la naturaleza de éstos (32,33).

Compuestos del boro: suele usarse el borax  $B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$  y la colemanita  $B_6O_{11}Ca_2 \cdot 5H_2O$ , generalmente junto con otras sustancias (32).

Cianamida, Cianuros y Tiocianatos. La cianamida de calcio  $CN_2Ca$  suele aplicarse a suelos que deben ser cultivados posteriormente, ya que de herbicida no selectivo en el momento de su aplicación pasa por hidrólisis a fertilizante según:



El tiocianato de amonio  $\text{SCN.NH}_4$  se obtiene como un subproducto de la destilación de la hulla, y a semejanza de la cianamida de calcio aporta nitrógeno al suelo (32).

Cloratos: fundamentalmente se usa el clorato de sodio; es el único herbicida no selectivo que aún encuentra amplia aplicación. Es excelente para esterilizar el suelo en forma temporaria. Entre sus inconvenientes están: considerable toxicidad frente a mamíferos, carácter explosivo, el cual se puede disminuir por agregado de sales higroscópicas, y una rápida desaparición del suelo, en razón de su alta solubilidad (32,33).

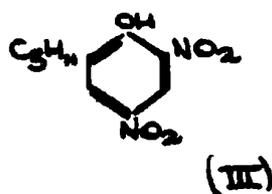
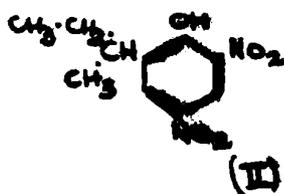
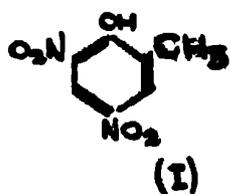
Acido Sulfúrico: cualquier ácido es un herbicida en potencia; el único económicamente factible es sin embargo el sulfúrico, que aún se usa en cierta escala, principalmente en Europa; sus efectos corrosivos y el peligro de su manejo lo hacen poco recomendable (32).

Inorgánicos varios: en mayor o menor escala han encontrado empleo como herbicidas los siguientes compuestos: ácido sulfámico,  $\text{H}_2\text{N.SO}_3\text{H}$ ; sulfamato de amonio,  $\text{H}_2\text{N.SO}_3\text{NH}_4$ ; cloruro de sodio,  $\text{ClNa}$ ; cloruro de calcio,  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ; sulfato de cobre,  $\text{SO}_4\text{Cu}$ ; sulfato ferroso,  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , etc. (32, 33 y 122).

Aceites minerales: varias fracciones de éstos se emplean como herbicidas, siendo semiselectivos; entre las especies cultivadas que los resisten muy bien cabe citar acelgas y zanahorias (32, 33 y 110).

## HERBICIDAS SELECTIVOS

Nitrofenoles: varios dinitrofenoles han encontrado amplio uso como herbicidas selectivos y generales; los más usados son: 4,6-dinitro-*o*-cresol (I), 2,4-dinitro-6-*sec*-butil-fenol (II), 2,4-dinitro-6-*iso*-amil-fenol (III)



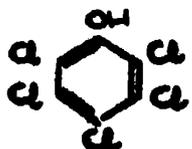
Se los emplea como soluciones acuosas de sus sales de sodio o de alcanolaminas, o como soluciones emulsionables de los fenoles libres en aceites o kerosena. En baja concentración son selectivos para dicotiledóneas, son de bajo costo y su único inconveniente es el de actuar como colorante (32, 33 y 53).

Compuestos clorados: los más importantes son: pentaclorofenol  $C_6Cl_5.OH$  (IV) y ácido tricloroacético  $CCl_3.CO.OH$ ; requieren cantidades relativamente grandes pero son de bajo costo; se los emplea como sales sódicas o como soluciones emulsionables en aceites (32, 53 y 122).

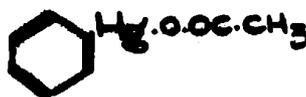
Compuestos de mercurio: varias sales de mercurio con ácidos orgánicos han sido ensayadas exitosamente como herbicidas selectivos; la más usada es el acetato de fenilmercurio (V) (32).

Ureas sustituidas: varias ureas sustituidas, todas ellas asimétricas, han demostrado poseer notable actividad herbicida de carácter selectivo para gramíneas, al revés de la mayor parte de los otros herbicidas selectivos; son además los primeros compuestos orgánicos de retención

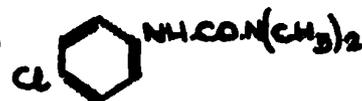
en el suelo, pudiendo emplearse como esterilizantes temporarios; el más importante entre los compuestos de este tipo es la 3-(p-clorofenil)-1', 1'-dimetilurea (CMU) (VI) (32, 65, 122).



(IV)



(V)



(VI)

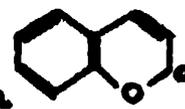
Aroilcarbamatos: son estructuralmente análogos a los anteriores. Los más importantes son el fenilcarbamato de isopropilo (VII) y el p-clorofenilcarbamato de isopropilo (VIII), el primero de ellos selectivo para monocotiledóneas. Tienen el inconveniente de ser muy poco solubles, dificultando así su dispersión ( 32, 33 y 122 )



(VII)

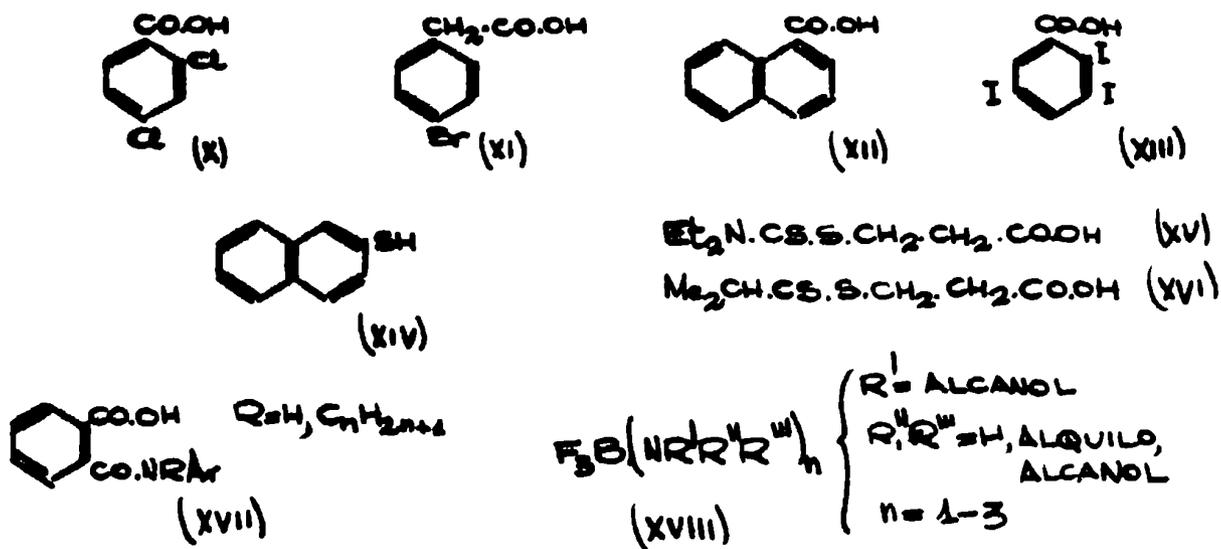


(VIII)



(IX)

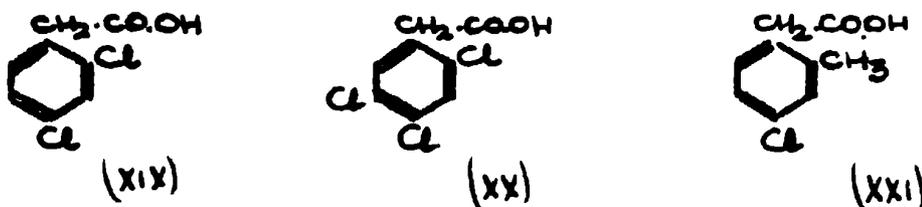
Varios: la literatura, en especial la de patentes describe numerosos compuestos de los cuales se dice que poseen acción herbicida. Citaremos: cumarina (IX) (3), varios ácidos y sales de ácidos monocarboxílicos aromáticos e hidroaromáticos ( X a XIII ) ( 50, 71, 125, 127 ), acetoacetato de decilo (48), Tiofenoles ( XIV ) (101), ditiocarbamatos y xantatos (XV, XVI) (105), ácidos N-arilftalámicos (XVII) (44), complejos del F<sub>3</sub>B con alcanolaminas (XVIII) (99), o mezclas complejas como ser residuos de la destilación de alcoholes obtenidos por el método "Oxo" (66)



ACIDOS ARILOXIACETICOS Y SUS DERIVADOS

Pasaremos ahora a considerar a los más importantes de los herbicidas técnicos, los derivados ariloxiacéticos y entre ellos fundamentalmente al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (XIX).

Varios factores han contribuido a su preeminencia en el campo de los herbicidas, principalmente su elevada toxicidad y su bajo costo, condicionado por una síntesis muy sencilla a partir de diclorofenol y ácido cloroacético. El ácido libre (XIX), es un sólido blanco, muy poco soluble en agua; casi nunca se lo emplea porque su baja solubilidad obligaría a usar volúmenes prohibitivos de agua para dispersarlo; los derivados funcionales más importantes desde el punto de



vista práctico son: a) la sal sódica, bastante usada; es mucho más

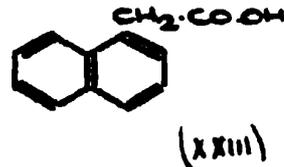
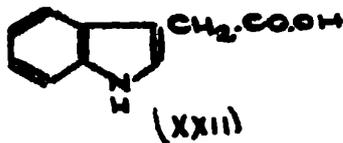
soluble que el ácido libre, pero no lo suficiente para los pulverizadores de bajo volumen; b) las sales de aminas ( mono-, di- y trietilamina) y de alcoanolaminas ( mono-, di- y trietanolamina); son líquidas y miscibles con agua en cualquier proporción. Se las prefiere para usar con pulverizadores de bajo volumen, con los cuales se usan unos 10 a 15 litros de litros de líquido por hectárea; las sales de aminas, siendo líquidas, no obstruyen los picos de pulverización. c) Esteres, en general de metilo, etilo, isopropilo y butilo; son líquidos como las sales de amina, pero insolubles en agua; se los emplea, ya sea sueltos en kerosens, emulsionados en agua, o impregnando sólidos adecuados, tales como tierra de infusorios. Los ésteres, siendo liposolubles, penetran muy bien en plantas poseedoras de cutículas cerosas; un inconveniente que presentan es su volatilidad, y en días de calor sus vapores pueden ser arrastrados hasta campos adyacentes y dañar cultivos de especies sensibles, como el algodón ( 7, 12, 21,23,24,32,39, 53,61,63,72,78,93,122).

Muy estrechamente relacionados al 2,4-D en sus estructuras y en sus propiedades fitotóxicas, están el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (XX) y el ácido 2-metil,4-clorofenoxiacético (XXI) (7,12,32,53).

Todos los compuestos de este grupo son altamente tóxicos para las dicotiledóneas, y relativamente inertes frente a las monocotiledóneas; su aplicación obvia y más general se halla por lo tanto en los cultivos de cereales para liberarlos de malezas; es de hacer notar, sin embargo, que ya a concentraciones moderadas, la toxicidad es general para toda clase de vegetales (32).

A muy bajas concentraciones los efectos de este grupo de herbicidas son muy semejantes a los de las hormonas naturales, tales como el ácido indoleacético (XXII). Pasaremos revista a continuación a las aplicaciones prácticas de los ácidos ariloxiacéticos cuando se los emplea en concentraciones subletales:

a)- Formación de raíces: la aplicación de estos compuestos a cualquier parte del tallo vegetal hace aparecer raíces en dicho punto; la aplicación obvia es en los viveros, para reproducir plantas a partir de gajos (24, 32, 42, 43, 79, 81, 83, 127, 128); en la práctica estos compuestos casi no se emplean sino otros relacionados pero carentes de poder herbicida tales como el ácido indoleacético (XXII) o el naftaleno acético (XXIII)



b)- Formación de flores: algunas especies responden a un tratamiento hormonal con aparición de flores; en la práctica se ha usado principalmente para el ananá, generalmente empleando ácido naftalenoacético y logrando de esta manera distribuir la producción de fruta a lo largo de todo el año ( 32, 82, 83 ).

c)- Partenogénesis de frutas: la aplicación de estos compuestos a ciertas especies de plantas en floración, lleva a la obtención de frutos partenogénéticos; estos frutos carecen de semillas y en condiciones favorables son de pulpa maciza, colocándolos en condiciones de mejor aceptación en el mercado. El comportamiento de las diversas espe-

cies y variedades de una misma especie, es, sin embargo, bastante errático y las condiciones deben ser muy bien estudiadas para cada caso particular.

Se aplica comercialmente a tomates e higos, y se ha ensayado con resultados más o menos dudosos para paltas, cucurbitáceas y frutillas (14,15,24,32,76,81,90,103,106,109,126,128).

d)- Madurez y caída de frutos: estos compuestos, actuando sobre ciertas especies vegetales son capaces de acelerar el proceso de madurez y de retardar la caída de los frutos, antes de madurar, y una vez maduros; la especie que mejor responde es el manzano, pero con mucha diferencia de una variedad a otra; otras especies que responden son el peral y el naranjo (8,9,10,24,28,29,30,32,40,41,62,109).

e)- Inhibición de brotes: los ácidos ariloxiacéticos han sido usados ocasionalmente para este fin, si bien el compuesto más generalizado es el ácido naftaleneacético; el almacenaje de papas y otros tubérculos es la aplicación práctica más importante de este efecto (24,32,83,85).

f)- Aplicaciones varias: entre otras cosas se han usado los ácidos ariloxiacéticos para inhibir la formación de frutas en especies ornamentales (19), para conservar frutos almacenados (54,73,104) y para conservar el follaje de ramas cortadas (69).

### MECANISMO DE ACCION DE HERBICIDAS

Podemos distinguir aquí dos procesos diferentes e independientes, a saber: en primer lugar la penetración del agente químico en el tejido vegetal y en segundo su acción específica en éste (7,72).

a)- Penetración: para la mayor parte de los herbicidas actuales, el método de aplicación es la pulverización sobre el follaje, y su penetración se realizará a través de éste; en general las hojas están revestidas por una cutícula y la estructura y composición química de ella determinan su eficacia como barrera opuesta a la penetración. La cutícula está compuesta por celulosa, pectinas, cera, y cutinas. La celulosa y las pectinas son del tipo de los polisacáridos, netamente hidrofílicas, y permeables por lo tanto al agua, sales y compuestos polares. Las cutinas son polímeros de ácidos y alcoholes de alto peso molecular; las ceras de cutinas son ésteres de ácidos grasos con alcoholes de peso molecular más bien bajo; tanto las cutinas como las ceras de cutinas, son lipofílicas, y permeables a los compuestos no polares en general. La proporción y la distribución de estos cuatro componentes, la cual depende de la especie y de la edad, es la que condiciona el acceso del herbicida al tejido y el tipo más conveniente de herbicida a emplear (22,23,73,117,116). En general la superficie de las hojas es predominantemente hidrófoba y los compuestos no polares son los que penetrarán con más facilidad.

Así, los dinitrofenoles libres, poco polares, son mucho más tóxicos que sus sales de sodio, fuertemente polares (23), y los ésteres alifáticos del 2,4-D son de 2 a 4 veces más tóxicos que sus sales de sodio; ahora bien, una vez atravesada la cutícula, la situación es

la inversa, ya que el medio de los tejidos es netamente hidrófilo y en efecto, se comprueba que los ésteres del 2,4-D, una vez en los tejidos, son transportados mucho más lentamente que las sales; los ésteres glicoles 2,4-D, en cambio por ser lipo- e hidrosolubles, reúnen ambas condiciones, de fácil penetración y fácil transporte.

b)- Modo de acción: como ya se ha visto, los primeros agentes usados para el control y destrucción de malezas, fueron compuestos orgánicos e inorgánicos sencillos, en general sales, usadas en soluciones concentradas. Una clasificación de estos agentes por su modo de acción, permite distinguir compuestos plasmolíticos, tales como  $\text{ClNa}$ ,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{NO}_3.\text{NH}_4$  ó  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , citolíticos como  $\text{SO}_4\text{Cu}$  y precipitantes proteicos como  $\text{SO}_4\text{Fe}$ . La hipertonicidad es condición imprescindible para los agentes plasmolíticos, en tanto que la efectividad de los citolíticos y de los precipitantes proteicos depende de la movilidad y fuerzas iónicas.

La efectividad de todos estos compuestos depende en alto grado de factores tales como el clima, ( en cuanto a temperatura y humedad ) y de la naturaleza del suelo ( 32, 33).

Pasando ahora a los compuestos más o menos selectivos, daremos una somera reseña de su modo de acción:

Clorato de sodio  $\text{ClO}_2\text{Na}$ : es uno de los pocos compuestos inorgánicos aún en uso y sus efectos no son los de hipertonicidad comunes a otras sales de este tipo, sino más bien los de una verdadera fitotoxicidad. Su efectividad, una vez incorporado al suelo es inversamente proporcional a la humedad de éste, la cual tiende a arrastrarlo y es directamente proporcional al contenido en materia orgánica y nitratos.

Cuando se lo aplica al follaje, es rápidamente absorbido y transportado a las raíces, y este transporte se realiza a través del xilema al revés de los compuestos orgánicos que son transportados a través del floema.

El efecto inmediato del clorato de sodio, cualquiera sea su forma de aplicación, es una rápida clorosis. El mecanismo primeramente propuesto era la formación de  $\text{ClO}_2^-$  ó  $\text{ClO}^-$ , pero ello parece muy poco probable; el mecanismo actualmente admitido es el de una exaltación del metabolismo de los hidratos de carbono, y una inhibición de la catalasa (32,33).

Arsénico: la efectividad de los compuestos del arsénico, depende de su estado de valencia, siendo muy tóxico el As trivalente y muy poco el pentavalente; el  $\text{As}^{+III}$  parece poderse combinar con los grupos -SH de algunas dehidrogenasas, inhibiendo la respiración celular; es relativamente específico en el sentido de que las plantas ricas en S (leguminosas, crucíferas) son mucho más susceptibles a su acción que aquellas pobres en S, como las gramíneas. Es interesante hacer notar que el As es capaz de sustituir, en pequeña proporción al P en algunos ciclos de degradación de azúcares (32,33).

Dinitrofenoles: en altas concentraciones actúan como precipitantes de proteínas, pero en las usadas para control de malezas, la acción parece ser fundamentalmente un aumento notable en la respiración, la cual llega a 2 ó 3 veces el valor normal; se observa además una inhibición de varias enzimas de fosforilación y de varias enzimas flavo-proteicas (33).

**Aceites:** su forma de acción es completamente desconocida; únicamente cabe observar que las fracciones aromáticas son más tóxicas que las alifáticas (33, 110).

**Ureas:** las semillas plantadas en suelos tratados con ureas fitotóxicas, nacen normalmente pero al poco tiempo la plantita ofrece un cuadro de clorosis progresiva que finaliza con la muerte; esta misma clorosis aparece en las plantas adultas así tratadas. El mecanismo de esta acción está relacionado con el metabolismo de N, afectando especialmente su absorción a partir del suelo (33,65).

**Arilcarbamatos:** son notables entre los compuestos usados actualmente por actuar como narcóticos o tóxicos mitóticos; su acción detiene la división celular en metafase, y da por resultado aberraciones nucleares y cromosómicas. Las plantas así tratadas presentan hiperplasia y reducción en el crecimiento, y su color suele ser además mucho más verde que en el vegetal normal, debido a un aumento en el contenido de clorofila, el cual oscila entre 18 y 28 %; se observa además un mayor porcentaje de nitrógeno, pero esto puede deberse al menor crecimiento; la respiración se ve disminuida, por la inhibición de varias dehidrogenasas. Es de hacer notar que el inositol es capaz de contrarrestar casi totalmente los efectos antes citados, incluyendo las aberraciones mitóticas, y esto parece ser un fenómeno general para varios narcóticos de plantas (33).

## II) MECANISMO DEL 2,4-D Y SUS ANALOGOS

Daremos a continuación una exposición detallada de los conocimientos actuales acerca del mecanismo de acción de los compuestos ariloxiacéticos.

El detalle más sugerente en cuanto a la acción del 2,4-D, es su manifiesta analogía con varias hormonas que se hallan como componentes normales de las plantas, y de las cuales la más conocida es el ácido 3-indoleacético (XXII) (10,16,24,32,34,43,56,63,77,83,84,118, 120,127,128). Los efectos que presentan analogías son: elongación celular que da por resultado las polaridades en el crecimiento y los tropismos; iniciación de raíces, activación del cambium, estimulación del callo, inhibición de brotes laterales, estimulación del desarrollo y madurez de frutos, etc. (8,9,10,14,15,24,28,29,30,32,40,41,75, 76,80,81,82,83,84,85,90,103,106,109,125,126,127,128). Ahora bien, los efectos que estamos considerando, no pueden deberse, al menos exclusivamente, a la acción hormonal, ya que el 2,4-D es un potente herbicida, en tanto que el ácido 3-indoleacético es casi inerte en ese aspecto; hay quienes han tratado de basar el mecanismo herbicida en una acción puramente hormonal (85), pero en forma poco convincente.

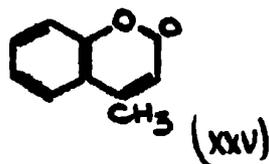
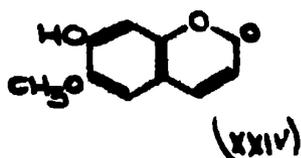
Dejando ya a un lado esta acción hormonal y las hipótesis basadas en ella, se han seguido dos caminos principales en el estudio del mecanismo de acción: a)- estudiar los fenómenos que presentan las plantas tratadas, y en base a ellos tratar de retroceder a las causas que los originaron y b)- tratar de descubrir directamente los

efectos iniciales del herbicida, haciéndolo actuar en sistemas o condiciones simplificadas.

La introducción del 2,4-D en un vegetal, da por resultado una serie de alteraciones químicas, fisiológicas y estructurales muy manifiestas, pero es muy problemático asignar algunas de ellas como causa de la muerte; en muchos casos al menos, parece que la muerte es un efecto secundario debido a invasiones bacterianas favorecidas por las condiciones anómalas de los tejidos (118); entre estas se cuentan: dificultad para el transporte de metabolitos por alteración del tejido vascular (27,77,108); disminución en la fotosíntesis (83, 95) y aumento en la respiración (16,46,83,123).

Otros procesos fisiológicos que se ven afectados en menor proporción son: absorción de agua, de nitratos, de potasio y pérdida de agua por transpiración (16,85,80,118). En cuanto a la composición química, se observan alteraciones que pueden llegar a ser muy marcadas tanto en contenido como en composición de proteínas, azúcares, lípidos, vitaminas y pigmentos (11,16,31,55,59,73,74,80,91,92,114). No se tienen datos realmente sistemáticos y comparativos de estas alteraciones, y parecen variar mucho con la especie y las condiciones de aplicación.

Suele notarse también un aumento de ciertos compuestos relacionados con la cumarina (IX), todos ellos dotados de considerable toxicidad general; se han identificado la escopoletina (XXIV) y la  $\beta$ -metilumbeliferona (XXV) ( 3,85).



Ninguno de estos compuestos, sin embargo, produce efectos semejantes al 2,4-D.

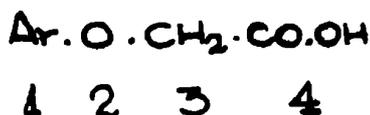
Lo más criticable en casi todos los datos referentes a alteraciones producidas por herbicidas, es el de haber sido obtenidos sobre vegetales que ya habían sufrido lesiones muy serias o que estaban moribundos; en esas condiciones estamos muy lejos de los efectos primarios del herbicida.

Una mejor concordancia se observa en los efectos del 2,4-D sobre enzimas; si el estudio ha sido hecho sobre la planta total, los resultados son contradictorios pero si se emplean sistemas simplificados usando enzimas puras, los datos son concordantes y reproducibles (37,70,118). Así, el 2,4-D en concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  M tiene muy escasos efectos sobre la amilasa, ácido ascórbico, oxidasa, catalasa, citocromo oxidasa, ácido glicólico oxidasa,  $\alpha$ -hidroxiácido oxidasa, invertasa, peroxidasa, fenolasa y amilofosferilasa. Respecto de la lipasa, se observa que la del trigo, planta no sensible, es apenas afectada en tanto que la del ricino, muy sensible, es fuertemente inhibida; la ácido indoleacético oxidasa es activada. Es de hacer notar que estas enzimas son solamente una pequeña fracción de las muchas que existen en el vegetal (70,88,118).

La actividad de los ariloxi-compuestos, depende en alto grado de su estructura, y pasaremos ahora a considerar la influencia de ésta. La evaluación cuantitativa de la actividad de estos compuestos no se basan en la determinación de dosis tóxicas o letales, como se acostumbre en toxicología, ya que la muerte de un vegetal es un proceso bastante indefinido y difícil de apreciar; se hace uso en cambio de los efectos formativos que ejercen estos compuestos en concentra-

ciones subletales, y para los cuales existen métodos standard que arrojan resultados comparables (24,32,34,42,43,,56,112,125).

Para estudiar el efecto de cambios en la estructura, conviene considerar a la molécula del ariloxi compuesto (XXVI) dividida en cuatro partes:



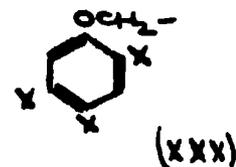
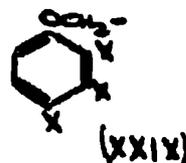
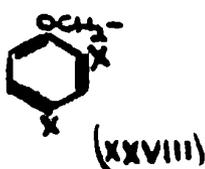
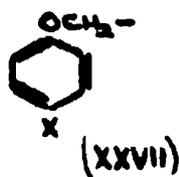
(XXVI)

1)- Anillo aromático, 2)- Oxígeno etéreo, 3)- Metileno y 4)- Carboxilo.

La introducción de halógenos en posiciones adecuadas confieren toxicidad; los sustituyentes de otra naturaleza tienen poco o ningún efecto; el F y el Cl son casi equivalentes; el Br es bastante menos activo, y el I mucho menos:



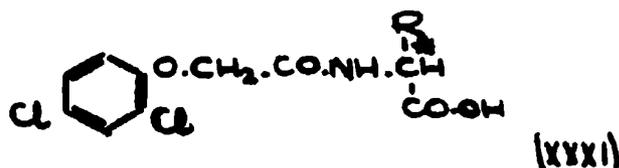
Las posiciones del halógenos que comunican toxicidad, son: 4 (XXVII); 2,4- (XXVIII); 2,3,4- (XXIX) y 2,4,5- (XXX)



La sustitución del O etéreo por N reduce la actividad a un 1%, y el S la anula del todo :



La sustitución del carboxilo por derivados funcionales, no altera mayormente la actividad, y aún la puede exaltar; entre los grupos estudiados están: éster-CO.OR, amida-CO.NH<sub>2</sub>, anilida-CO.NHPh, ureída-CO.NH.CO.NH<sub>2</sub>, hidrazida - CO.NH.NH<sub>2</sub>, nitrilo-CN, cloruro de ácido-CO.Cl; posiblemente todos ellos pasan por hidrólisis a carboxilo. Cuando el carboxilo se reemplaza por un grupo que requiere oxidación para pasar a éste ( alcohol-CH<sub>2</sub>.OH, amina-CH<sub>2</sub>.NH<sub>2</sub>), la actividad fisiológica se mantiene, pero bastante atenuada; esto lleva a suponer de que es indispensable la presencia de un carboxilo libre, o de un grupo capaz de darlo con facilidad. En su apoyo hay un trabajo reciente relativo a los enantiomorfos de los N- (2,4-diclorofenoxiacetil)-aminoácidos (XXXI); en ellos los isómeros L son tan activos como el

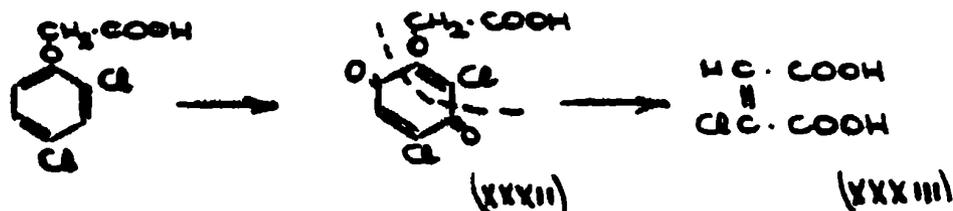


2,4-D libre, en tanto que los isómeros D son casi inactivos; esto puede interpretarse admitiendo que la forma L que es la de los péptidos naturales es fácilmente hidrolizada por las enzimas celulares para dar 2,4-D libre.

La sustitución de un H del metileno por un CH<sub>3</sub> no afecta la actividad; si el sustituyente es un etilo, o un grupo mayor la reduce notablemente; el reemplazo de ambos H por CH<sub>3</sub> la anula del todo; esto, que podría indicar la necesidad de un H libre, podría ser debido también a un efecto estereoquímico.

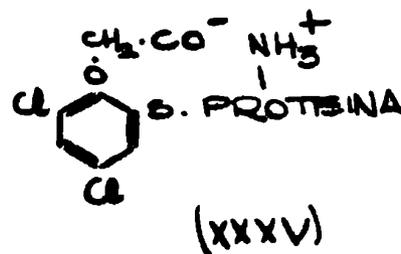
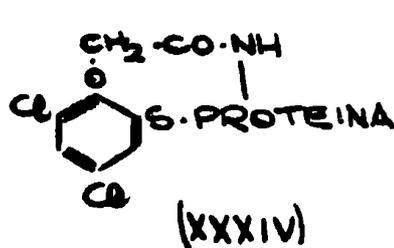
Entre las hipótesis estructurales hay una (57) que llega a la conclusión de que los compuestos activos requieren dos posiciones

en para libres de sustituyentes, sugiriendo que estos compuestos pasan en el vegetal a halógeno-quinonas (XXXII) tóxicas o a ácidos halógeno-maleicos (XXXIII), los cuales bloquearían los ciclos de ácidos dicarboxílicos.



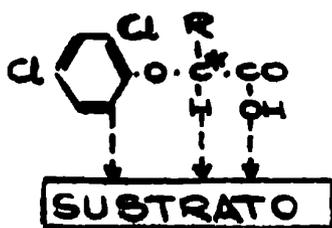
En contra de este supuesto, está el hecho de que hay muchos compuestos (ácidos 2,3,4-tricloro-; 3,4,5-tricloro; 4-Cl, 3,5,-dinitro-fenoxiacéticos) altamente activos que no poseen posiciones libres en para-; además se conocen varias quinonas del tipo (XXXII) y la hidrazida del ácido (XXXIII) que no son tóxicas, si bien los compuestos (XXXII y XXXIII) no han sido ensayados.

Otra hipótesis postula la necesidad de por lo menos una posición libre en orto respecto de la cadena lateral, fundándose en la escasa actividad de los compuestos que tienen ambas posiciones orto ocupadas; de acuerdo con éste, el 2,4-D se uniría a una proteína, en primera instancia a través del carboxilo, formando una sal o una amida, y completaría luego el enlace con otro grupo proteico, por ejemplo un sulfhidrilo a través de la posición orto libre (XXXIV, XXXV).

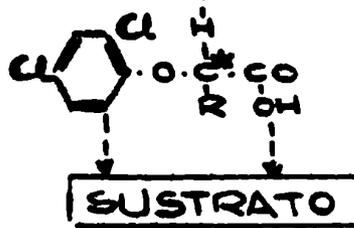


Si bien los compuestos o, o' - dihalógeno sustituidos son casi inertes, cabe hacer notar que existen derivados funcionales o, o'-disustituidos con alta actividad, lo cual invalidaría esta hipótesis.

Ya hemos visto la necesidad de tener un H libre en el metileno; si al otro se lo sustituye por un CH<sub>3</sub>, el C del metileno se hace asimétrico y el compuesto podrá resolverse en sus antípodas, y se ha hallado que la actividad de éstas es muy distinta (1,98); ello sugiere que la unión con el sustrato es del tipo siguiente:



(XXXVI)



(XXXVII)

(XXXVI) representaría la configuración activa y (XXXVII) la inactiva.

El uso de derivados marcados con C<sup>14</sup> ha permitido por primera vez seguir el desplazamiento y degradación de los ariloxiacéticos "in vivo". La degradación que puede sufrir el 2,4-D parece ser muy extensa aunque las cantidades que un vegetal puede metabolizar son pequeñas. A los pocos minutos de la aplicación, ya es posible hallar productos de degradación, y al cabo de unos días se encuentra C<sup>14</sup> en casi todo el material vegetal, incluyendo ácidos, azúcares, dextrinas, almidón, pectinas y proteínas. La naturaleza de los productos de degradación es desconocida; Helley (45) separó una fracción dializable que supene formada por un derivado del 2,4-D hidroxilado en el núcleo.

Muy interesante es asimismo la relación entre 2,4-D y las auxinas naturales; en efecto, se encontró que en presencia de 2,4-D el contenido ácido indoleacético baja a valores muy pequeños y se supone que ello es debido a la activación de una indoleacético oxidasa, efecto que ya fuera citado (37). Más recientemente se ha llegado a demostrar un verdadero antagonismo entre ambas hormonas en forma tal que la incorporación artificial de ácido indoleacético a un vegetal tratado con 2,4-D es capaz de inhibir completamente los efectos de éste (84,85,118); además cabe hacer notar que los efectos morfológicos en el vegetal, son al menos en parte, los que se pueden esperar para la ausencia de un mecanismo orientador de la multiplicación celular, tal como lo es la presencia de hormonas naturales.

Resumiendo: si se integran todos los datos presentados, puede llegarse a las siguientes conclusiones (118): El desarrollo del vegetal, en sus puntos de crecimientos, es la consecuencia de una división celular orientada, y ésta depende de la presencia de hormonas endógenas, presentes posiblemente como coenzimas unidas al material celular a través de uno o más puntos de la molécula.

La introducción de compuestos emparentados estructuralmente con las hormonas naturales, los hace competir con éstas en la fijación sobre el material celular, produciendo en éste un déficit de auxina. Si este déficit es pequeño, se manifestará en deformaciones foliares, pero al hacerse mayor aparecerán alteraciones y deformaciones en todo el vegetal y éstas darán como resultado secundario la muerte. La mayor o menor efectividad de los herbicidas estará dada por su analogía estructural con las hormonas naturales.

ACCION DE HERBICIDAS SOBRE MICROORGANISMOS

Frente a los tan notorios efectos ejercidos por los herbicidas selectivos sobre los vegetales superiores, cabe ahora preguntarnos si las formas inferiores de vegetación son afectadas en medida análoga. El interés que ello supone no es tan sólo de orden académico; en efecto, si la acción fitotóxica se manifestase con magnitudes de orden similar sobre vegetales superiores e inferiores, y si en estos últimos hubiere fenómenos de toxicidad selectiva, habría que esperar una alteración bien marcada en la microflora del suelo, con consecuencias difíciles de prever; podrían esperarse además efectos sobre las enfermedades fungales y microbianas de los vegetales y sobre los fenómenos de simbiosis tales como la nodulación de las leguminosas.

Por otro lado, siendo tan grande la capacidad de adaptación de los microorganismos y tan diversas las sustancias que son capaces de degradar, es razonable suponer, que en un suelo tratado con herbicidas, existan y se adapten especies capaces de degradarlos, contribuyendo de esta manera a su desaparición más o menos rápida.

La bibliografía referente a la acción de herbicidas sobre microorganismos, y aún sobre vegetales no fanerógamos, es muy escasa y contradictoria, lo cual de por sí constituye el mejor indicio de que no se puede esperar nada espectacular en este campo; pasaremos ahora revista a esta bibliografía, en el orden siguiente: a)- degradación del herbicida, b)- fitotixicidad.

a) - Si se incorpora al suelo un herbicida cualquiera, se observa que su concentración en éste disminuye gradualmente hasta desaparecer; podría suponerse que esto es debido exclusivamente al arrastre por el agua de lluvia, pero las siguientes experiencias indican que existe acción microbiana: si se pone en un frasco cerrado tierra que contenga herbicida, la concentración de éste disminuye hasta desaparecer y la desaparición es más rápida en suelos ricos en materias orgánicas. Si el recipiente con tierra es esterilizado al comienzo de la experiencia, la concentración del herbicida se mantiene constante.

Además se observa, que si se vuelve a agregar el mismo herbicida a la tierra del primer caso su desaparición será mucho más rápida, lo cual puede ser atribuido a un enriquecimiento en organismo degradador, o a la selección natural de mutantes más activos para este proceso (2,4,5,6,17,49). Este fenómeno parece ser general para los herbicidas selectivos, aunque los trabajos citados se refieren a 2,4-D y a MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético). Por otro lado estos fenómenos no nos deben extrañar, ya que existen numerosas especies capaces de proliferar sobre sustratos aparentemente mucho más inertes, tales como hidrocarburos aromáticos y parafínicos.

Zobell (129) presenta una extensa lista de organismos de diversos géneros aislados principalmente de suelos y capaces de vivir a expensas de petróleo y parafinas en estas condiciones. En cuanto a los metabolizadores de hormonas, se han aislado especies puras, pero sin llegar a su identificación (5,49).

b)- Toxicidad para microorganismos: El 2,4-D parece ser considerablemente tóxico para el género *Rhizobium*, afectando a la formación de nódulos sobre raíces de leguminosas a concentraciones que es-

tán por debajo de las fitotóxicas; el fenómeno se manifiesta por una disminución en el número de nódulos, marcadas alteraciones en su estructura, y en la morfología y caracteres tintoriales de los organismos (35, 86); otros autores contradicen esto, y atribuyen los fenómenos observados a una intoxicación del huésped (18).

Todo el resto de la bibliografía es de un carácter mucho más pobre y discordante; el 2,4-D parece ser tóxico para *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus hemolyticus*, *Strp. salivarius*, *Shigella paradysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus brevis*, *B. subtilis*, y *Aerobacter cloacae* (25,26,58,102), pero en general a concentraciones muy altas.

Los organismos Gram positivos parecen ser más susceptibles (113); lo mismo ocurre con los formadores de nitritos (97) y con los organismos que requieren oxígeno libre (123). En algunos casos se altera el metabolismo; así *E. coli* parece no producir gas a partir de caldo lactosado conteniendo 2,4-D (113).

Los hongos, en general parecen ser aún menos susceptibles que los Eubacteriales. El género *Actinomyces* parece ser poco afectado, como se desprende de su predominancia en suelos tratados con 2,4-D (115), y de los estudios efectuados sobre un parásito de papas, *Actinomyces scabies* (47); este mismo organismo parece ser sin embargo bastante sensible *in vitro* (36,68). Otros hongos patógenos de los géneros *Pythium*, *Gibberella*, *Helminthosporium* y *Fusarium*, parecen ser inhibidos en su desarrollo, aunque es muy difícil diferenciar si los efectos observados son debidos a una intoxicación del parásito o del huésped (13,58,124). Los hongos saprófitos de los géneros *Aspergillus*

**Penicillium, Rhizopus y Alternaria** sufren efectos visibles tan sólo a concentraciones muy elevadas (20,58,60,102), si bien parece que sus esporas son fuertemente inhibidas por fumigación con los vapores de los ésteres (38). Las levaduras sufren una ligera inhibición pero presentan desarrollo aún con concentraciones de un gramo de 2,4-D por litro (121).

PARTE EXPERIMENTAL

MEDIOS DE CULTIVO

a)- Medio de Czapek (111)

Agua..... 1000 ml  
NO<sub>3</sub>Na ..... 3 g.  
PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K ..... 1 g.  
SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O ..... 0,5 g.  
ClK ..... 0,5 g.  
SO<sub>4</sub>Fe.7H<sub>2</sub>O ..... 0,01 g.  
Sacarosa ..... 30 g. (')  
Agar ..... 20 g.

(') 150 g. para *Aspergillus repens* (grupo *Glaucus*)

b)- Extracto de malta

Agua ..... 1000 ml.  
Extracto de malta(Difco).. 20 g.  
Glucosa ..... 40 g.

c)- Medio de Wickerham (87)

Agua ..... 1000 ml.  
Glucosa ..... 10 g.  
SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> ..... 1 g.

Sales

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ .....	0,875 g.
$\text{PO}_4\text{HK}_2$ .....	0,125 g.
$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,50 g.
$\text{ClNa}$ .....	0,10 g.
$\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,10 g.

Oligoelementos

B como $\text{BO}_3\text{H}_3$ .....	0,01 p.p.m.
Cu como $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 p.p.m.
I como IK .....	0,1 p.p.m.
Fe como $\text{Cl}_3\text{Fe}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	0,05 p.p.m.
Zn como $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0,07 p.p.m.

Vitaminas

Biotina .....	2 $\mu\text{g}$ .
Pantotato de Ca .....	400 $\mu\text{g}$ .
Inositol .....	2000 $\mu\text{g}$ .
Niacina .....	400 $\mu\text{g}$ .
Ac.p-aminobenzoico .....	200 $\mu\text{g}$ .
Clorhidrato de Tiamina ...	400 $\mu\text{g}$ .
Rivoflavina .....	200 $\mu\text{g}$ .

CEPAS EMPLEADAS

Todas ellas fueron obtenidas del Instituto de Microbiología Agrícola del Ministerio de Agricultura.

Levaduras:

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-1-3
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	L-1-4
<i>Torula utilis</i>	L-10-1
<i>Torulopsis utilis</i>	L-16-1

Hongos: se emplearon las especies tipo de los 14 grupos de *Aspergillus* dados por Thom y Raper (111).

<i>A. clavatus</i>	M-1-135	NRRL 2
<i>A. repens</i>	M-1-136	NRRL 17
<i>A. fumigatus</i>	M-1-137	NRRL 163
<i>A. nidulans</i>	M-1-138	NRRL 187
<i>A. ustus</i>	M-1-139	NRRL 278
<i>A. flavipes</i>	M-1-140	NRRL 286
<i>A. versicolor</i>	M-1-143	NRRL 238
<i>A. terreus</i>	M-1-166	NRRL 1960
<i>A. candidus</i>	M-1-145	NRRL 312
<i>A. niger</i>	M-1-146	NRRL 334
<i>A. Wentii</i>	M-1-147	NRRL 375
<i>A. tamarii</i>	M-1-148	NRRL 429
<i>A. flavus</i>	M-1-167	NRRL 484
<i>A. ochraceus</i>	M-1-151	NRRL 398

HERBICIDAS

2,4-D, sal sódica: obtenida de Laboratorios Dr. Zappi. Para obtener la sal pura y el ácido libre, se procedió de la siguiente manera; el producto comercial fué disuelto en agua y filtrado para separar material insoluble. La solución límpida se calentó a ebullición y se acidificó con ácido clorhídrico para precipitar el ácido libre; esta solución se deja enfriar y se filtró por embudo Büchner. El ácido así obtenido se disolvió en un volumen considerable de agua destilada a ebullición; se dejó enfriar separándose así el ácido libre puro en forma de agujas cristalinas, las cuales se filtraron por embudo Buchner y se secaron en desecador con cloruro de calcio. La sal de sodio del 2,4-D se obtuvo a partir del ácido por disolución en la cantidad calculada de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  seguida de evaporación a baño maría de la solución resultante.

2,4-D, sal de alcanolamina: se empleó un producto comercial, "Esteron 40" de DOW. Este se presenta como un líquido viscoso, de color caramelo, y contiene 65 % de las sales de etanol - e isopropanolamina del 2,4-D.

2,4-D, éster isopropílico: se empleó un producto comercial, "Esteron 44" de DOW. Este se presenta en forma de un líquido móvil, de color ambarino, que contiene 44 % del éster isopropílico del 2,4-D y además, emulsionantes que le permiten ser dispersado en agua en forma de una emulsión muy estable, que resiste la esterilización.

**ENSAYOS PREVIOS:** No teniendo aún conocimientos relativos al grado de susceptibilidad de hongos y levaduras a la acción del 2,4-D, se decidió usar algún método capaz de dar un gradiente de concentración del herbicida en un medio sólido. Se emplearon dos técnicas, basadas en las que se usan para investigación y dosaje de antibióticos (87). En ambos casos se obtuvieron cajas de Petri sembradas uniformemente con la especie a ensayar, en el medio adecuado, agar de Czapek para hongos y agar de malta para levaduras; para ello se hicieron suspensiones de esporas o de un cultivo en el agar fundido, agitando éste, y volcando en caja de Petri.

En un caso se colocaron sobre la superficie del agar, discos de papel de filtro de 8 mm. de diámetro, embebidos en una solución saturada de 2,4-D, y esterilizados luego, y en el otro, cilindros ( 8 x 6 mm. ), cortados con sacabocados de una caja de Petri en la cual se había volcado un agar que contenía 5:1000 de 2,4-D, sal sódica.

Estos ensayos comprendieron *Aspergillus niger*, *Rhizopus* Spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis utilis* y *Schizosaccharomyces octosporus*; en ningún caso pudo apreciarse inhibición; más aún, se pudo apreciar formación de colonias a lo largo del mismo cilindrito de agar con 2,4-D; y aún en la misma caja de Petri con agar y 2,4-D, exento de todo otro nutriente, aparecieron colonias de hongos como contaminantes.

De estos ensayos pudo deducirse que la susceptibilidad de los microorganismos a este herbicida es muy baja, y la necesidad de emplear cantidades apreciables de éste en los ensayos a realizar.

### HONGOS

Los efectos que pueden esperarse de un herbicida al aplicarlo a un vegetal superior o inferior son de tres tipos: a)- alteración en la velocidad del desarrollo, b)- alteraciones metabólicas, y c)- variaciones en la morfología. Cualquiera de estos efectos se prestará para seguir la acción del herbicida, y será necesario discernir cual será el más sencillo de evaluar en forma cuantitativa o semicuantitativa. Para nuestro caso, g) la variación de morfología fué descartada por presuponer una gran familiaridad con cada especie en su forma normal y por no prestarse además a una evaluación cuantitativa; b), las alteraciones del metabolismo, presuponen la toma de muestra a partir de un medio líquido a intervalos y el dosaje de algún compuesto que se degrade o que se forme durante el desarrollo del organismo; es el método más lógico para el caso de las levaduras, pero para los hongos, que crecen en forma de una capa superficial, implicaría la rotura y humedimiento de ésta durante las tomas de muestra. El tercer método o sea la medición de la velocidad de crecimiento, pareció el método más lógico para el caso de los hongos; en efecto, cultivándolos en forma de colonia gigante en caja de Petri, en medios a los cuales se ha agregado herbicida en cantidades variables, es posible obtener una medida grosera, pero sencilla de la velocidad de crecimiento, midiendo el área o el diámetro de las colonias formadas. Pueden además seguirse las alteraciones morfológicas ya sea a simple vista, o mediante la observación de la caja con el objetivo de bajo aumento.

La técnica que se empleó fué en definitiva la siguiente: se

preparó agar de Czapeck, y se lo dividió en 5 fracciones, a 4 de las cuales se incorporaron cantidades variables de 2,4-D, sal sódica, reservando la 5ª como testigo; estos medios se entubaron a razón de 15 ml. por tubo y se esterilizaron a 110° durante 30 min.; se tuvo así la siguiente serie de medios:

<u>NUMERO</u>	<u>CONCENTRACION</u>
N	0 (testigo)
1	1: 100 000
2	1: 10 000
3	1: 1000
4	1: 250

Para la siembra de colonias gigantes se empleó la técnica recomendada por Thom (111), que consiste en hacer una suspensión en agar fundido a 45° de esporas de la especie a sembrar, dejando solidificar; en esas condiciones basta tocar la suspensión de esporas con el ansa, y con ésta el centro del agar contenido en la caja de Petri. La suspensión en agar de las esporas permite sembrar con precisión en un punto determinado de la caja, evitando la aparición de colonias en otras partes de la superficie, lo cual sucede casi indefectiblemente por arrastre del polvillo de esporas, cuando se intenta sembrar éstas directamente.

Se sembraron de esta manera 2 cajas para cada concentración y especie; además para cada concentración se sembró una tercera caja con tres colonias dispuestas en triángulo, según indica Thom (111), a fin de tener mejores condiciones de observación al microscopio en las

zonas marginales.

Se emplearon las especies tipos de los 14 grupos en que Thom y Raper (111) dividen al género *Aspergillus*; el medio básico fué en todos los casos el de Czapeck, enriquecido con 150 g. de glucosa para *A. repens* (grupo *glaucus*), cuyo desarrollo en medios de azúcar al 3% es muy lenta.

Al cabo de un tiempo apropiado, (3-12 días), se realizó la observación de las colonias resultantes; con los diámetros de ellas se confeccionó la tabla I. Los valores de la tabla están afectados de errores que varían considerablemente de una especie a otra; en efecto, algunas de ellas como *A. flavipes* y *A. versicolor*, son de forma regular y de bordes muy netos, en tanto que otros, como *A. clavatus* o *A. fumigatus*, son floccosas y de bordes muy poco definidos, en el caso de *A. repens*, la falta de definición es muy notable, razón por la cual no se consignan mediciones para esta especie.

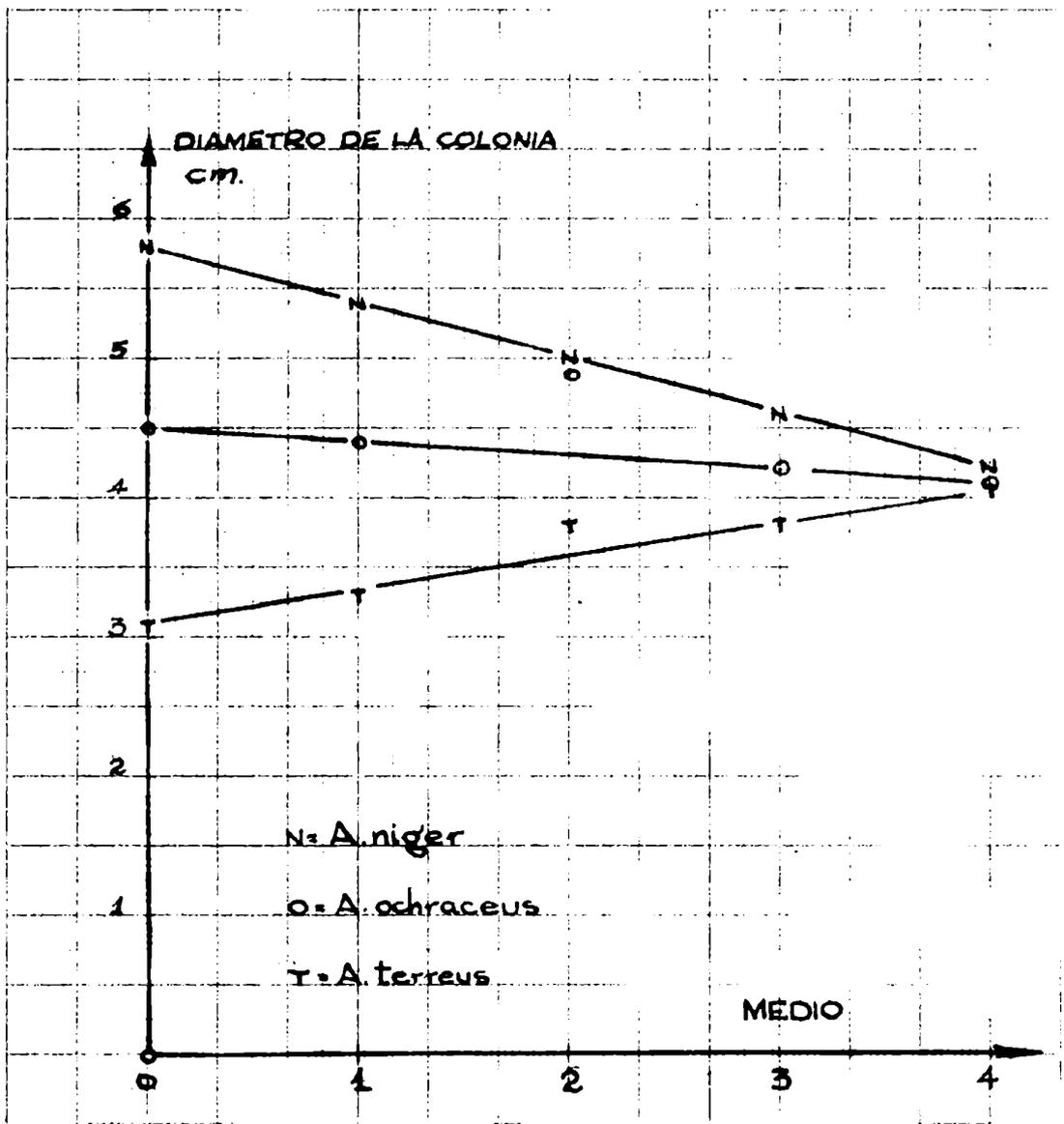
Los datos numéricos de la tabla I pueden ser llevados a un gráfico, como el I, en el cual se han consignado tres especies de comportamiento típico.

TABLA I

E S P E C I E		MEDIO 8/1			
	T	1	2	3	4
	sin 2,4-D	1,10-6	1,10-4	1,10-3	4,10-3
<i>A. clavatus</i>	5,5-6,0 5,6-6,0	5,6-5,7 5,2-5,3	5,3-5,6 5,2-5,4	5,0-5,3 5,1-5,2	4,5-5,2 4,7-5,3
<i>A. repens</i>					
<i>A. fumigatus</i>	5,1 5,3	5,0 5,0	5,2 4,9	5,2 4,7	4,9 4,7
<i>A. nidulans</i>	5,4-5,8 5,9-6,9	5,3-5,5 5,5-6,3	5,9-6,5 5,7-6,4	5,9-6,5 5,6-6,4	5,6-6,2 5,3-5,8
<i>A. ustus</i>	6,6 6,4	6,6 6,4	6,6 6,5	5,4 5,6	5,1 5,2
<i>A. flavipes</i>	4,1 3,9	3,9 4,3	3,8 4,0	3,8 4,2	3,8 3,9
<i>A. versicolor</i>	3,2 3,3	3,3 3,0	3,1 2,9	3,2 2,8	3,0 2,8
<i>A. terreus</i>	2,9-3,4 3,0-3,3	3,2-3,6 3,1-3,4	3,4-4,0 3,5-4,4	3,1-4,1 3,8-4,2	4,2-4,7 3,6-4,1

A. candidus	2,8	2,9	2,7	2,8	3,1	2,9	3,0	2,8	2,9	2,8
	3,0		2,9		2,8		2,6		2,7	
A. niger	6,0	5,8	5,3	6,4	4,9	5,0	4,6	4,6	4,2	4,2
	6,6		5,4		5,1		4,7		4,3	
A. Wentii	5,1	5,0	6,0-5,1	5,6	5,5-5,2	5,0	4,0	3,9	3,2	3,5
	5,0		6,0-5,4		5,1-4,2		3,8		4,0	
A. tamaritii	6,0	6,3	6,2	6,7	6,0	6,0	5,1	5,4	5,8	5,6
	6,6		7,2		6,0		5,6		5,4	
A. flavus	6,6	6,7	6,8	6,8	6,0	6,4	5,1	5,3	5,8	5,9
	6,7		6,8		6,8		6,5		5,0	
A. ochraceus	4,3-4,7	4,5	4,6-4,7	4,4	4,4-4,8	4,8	4,7-4,2	4,2	4,1-4,2	4,2
	4,3-4,8		3,8-4,6		5,0-5,2		3,9-4,0		4,4-4,0	

" "



En ordenadas se han llevado los diámetros de las colonias, como índice de velocidad de desarrollo, y en abcisas los números arbitrarios asignados a cada medio, en concentración creciente, desde 0 para el que carece de herbicida hasta 4 para el que contiene  $4.10^{-3}$ ; se observará que estas abcisas desde luego no guardan escala, pero ello no afecta la interpretación del gráfico que es sólo aproximado; si en las abcisas se emplean las concentraciones ( $0-4.10^{-3}$ ), resultaría desproporcionado, y los logaritmos de ellas tampoco se pueden emplear ( $\log 0 = -\infty$ ).

Del gráfico pueden concluirse dos cosas: a)- existen los tres tipos posibles de comportamiento frente al herbicida; inhibición, ( *A. niger* ); insensibilidad, ( *A. ochraceus* ) y estímulo, ( *A. terreus* ) b)- el 2,4-D no es fitotóxico para el género *Aspergillus*. (Diversas experiencias aisladas realizadas permiten afirmar que los otros géneros comunes de hongos tampoco son destruídos). *Aspergillus niger*, que es la especie más sensible se desarrolla aún perfectamente en un medio que contiene  $2,5.10^{-3}$  de 2,4-D o sea una concentración que no se encuentra nunca en un suelo tratado con herbicida con fines agrícolas.

Las colonias de las especies que figuran en la tabla I, fueron además observadas al microscopio con el objetivo de pequeño aumento, para poder apreciar las variaciones morfológicas; éstas fueron en general muy poco marcadas y varias especies ni las presentaron; se observaron alteraciones en las especies siguientes:

*A. nidulans*: colonias más flecosas, con menos exudado.

*A. candidus*: aumento en la proporción de conidióferos pequeños, y aspecto manifiestamente penicilado de ellos.

A. niger: es la única especie afectada muy visiblemente; al aumentar la concentración de 2,4-D, la colonia pasa de flocosa, con bordes esfumados ( en el sentido de que la cantidad de conidióforos disminuye gradualmente hacia la perifería ), a flocosa, pero bastante más compacta, con la zona oscura de los conidióforos terminando abruptamente hacia los bordes.

El color de la zona fructífera pasa de negro en las cajas T y 1, a un negro pardusco en 2, 3 y 4. El borde del micelio vegetativo que es amarillo limón y difuso en el medio normal, se hace blanquecino con bordes netos en 1, 2 y 3 y pasa a un color amarillo intenso en 4. El reverso de la colonia pasa de amarillo pálido con el centro pardusco en N, a pardo amarillento con bordes amarillo vivo y centro casi negro en 4. Al microscopio se aprecia una disminución en el tamaño de los conidióforos al pasar de 1 a 4, como asimismo la aparición de un exudado de color púrpura oscuro, en gotitas a partir de 1. En A. niger se pudo apreciar además dos veces un fenómeno que no se repitió en ninguna de las otras especies estudiadas, y que consistía en que el medio 4, en vez de aparecer la colonia ligeramente alterada ya descrita, aparecía otra, de micelio escaso y blanco, con un diámetro que no llegaba a exceder de 0,5 cm., y que presentaba a lo sumo 40-50 conidióforos pequeños y deformes.

A. Wentii: disminución del borde blanco de la colonia.

A. tamaris: aspecto deshilachado de los conidióforos en los medios 3 y 4.

A. flavus: aumento en el tamaño de los conidióforos y color más oscuro de la colonia.

### LEVADURAS

Cuando se comenzó a estudiar la acción de los herbicidas sobre las levaduras, se consideraron factibles dos tipos diferentes de métodos para la evaluación cuantitativa de su acción; ambos se ensayaron, y uno de ellos se empleó con éxito.

El método que parece más inmediato es el de determinar la velocidad de desarrollo de la levadura en medios a los cuales se ha adicionado herbicida; en efecto si se siembran medios de cultivo que contienen diferentes concentraciones de inhibidor, con iguales inóculos de la levadura a ensayar, el número de células que se encontrarán al cabo de un tiempo dependerá de la acción herbicida y nos dará una medida de su capacidad.

Se ensayó este método en la forma siguiente: se preparó un medio de mosto de malta con concentraciones de 2,4-D entre  $10^{-2}$  y  $10^{-5}$  M., y con 2,4-D, sal de alcanolamina entre  $10^{-1}$  y  $10^{-5}$  M. Este medio se pasó en tubos anchos a razón de 25 ml. por tubo, y se los esterilizó a  $110^{\circ}$  durante 30 minutos. En cada tubo se sembraron 2 ml. de un cultivo de 48 horas de *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de malta, dejando incubar luego durante 48 horas. En el líquido resultante se intentó el recuento de células sacando muestra con una pipeta cuentaglobulos y pasando sin diluir a una cámara de recuento. El tamaño de las células de levadura es muy próximo al de los hematíes, y su recuento no ofrecería mayores inconvenientes, a no ser por la tendencia de las levaduras a presentarse en forma de racimos de células, con 20 o a veces más individuos, dispuesto en varios planos, lo cual hace completamente inseguro el recuento de estos grupos; en vista de ello

y a las dificultades para disponer de cámara cuentagl6bulos, se decidi6 no seguir ensayando el m6todo. Cabe hacer notar que en el medio  $10^{-7}$  M en herbicida las levaduras se presentan en n6mero muy escaso, son peque1as y de tama1o irregular. Una variante de este m6todo fue empleada por West y Henderson (121); estos autores cultivaron levaduras en un medio l6quido con cantidades variables de 2,4-D, y determinaron el n6mero de c6lulas en forma indirecta midiendo la transmitancia del medio fermentado con un Cenco Photometer. Los resultados de estos autores son los de la tabla que figura a continuaci6n:

TABLA II

<u>Concentraci6n</u>	<u>Transmitancia</u>
2,4-D; p.p.m.	%
testigo	20
0,001	21
0,01	22
0,1	21
1,0	22
10	23
100	46
1000	82

Puede apreciarse que el efecto del 2,4-D se hace visible reci6n a una concentraci6n de 100 partes por mill6n. En nuestro caso este m6todo no pudo ensayarse por carecer de aparato adecuado; es indudable que esta t6cnica turbidim6trica es la m6s c6moda y r6pida como for-

ma de seguir el desarrollo, sacando muestras a intervalos regulares y es inaplicable tan sólo en el caso de medios que contengan ésteres del 2,4-D emulsionados, ya que éstos confieren turbidez al medio aún en ausencia de células.

Otra técnica que se ensayó para reemplazar al recuento directo fué la siguiente: se preparó mosto de malta con cantidades variables de 2,4-D y su sal de alcanolamina, como en el otro ensayo, y los medios resultantes se pasaron a tubos anchos a razón de 25 ml. por tubo, esterilizando a 110° durante 30 min. En cada tubo se sembraron 2 ml. de un cultivo de 48 horas de *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de malta, y se dejó desarrollar durante 48 horas. Se agitó para suspender las células y se pasaron muestras a albuminómetros de Nissl; (estos son tubos de centrifuga de 2 ml. de capacidad que terminan en su parte inferior en un tubo estrecho graduado de 0,1 ml. de capacidad y se los emplea para el dosaje de proteínas en líquido céfalorraquídeo); se procedió a centrifugar, y se leyó el volumen resultante de levadura en la porción estrechada del tubo. Se pudo comprobar que: a)- el volumen de levadura era demasiado pequeño para lograr una buena lectura, y b)- no era posible apreciar diferencias de un medio a otro, salvo para las mayores concentraciones del herbicida que daban un volumen despreciable de depósito.

El segundo método a que se hizo referencia y fué en definitiva el que se aplicó, es un método indirecto, y consiste en medir alguna actividad metabólica como índice del desarrollo.

Todas las especies de levaduras se caracterizan por degradar sustratos carbohidratados ya sea fermentativa - u oxidativamente (87), de manera que si en el medio se dosan azúcares a intervalos regulares,

se podrán construir curvas que expresen la concentración de azúcar como función del tiempo, y es perfectamente razonable esperar que una levadura que se desarrolló en un medio que contenga inhibidor, metabolice al sustrato más lentamente que aquella que crezca en un medio normal y esto es lo que pudo comprobarse en todos los casos.

El medio que se empleó fué el Wickerham(87), empleando glucosa como carbohidrato y  $SO_4(NH)_2$  como fuente de N; siendo un medio sintético es perfectamente reproducible en sus propiedades, lo cual es muy deseable para fines comparativos. Se prepararon medios de Wickerham con las concentraciones siguientes de herbicida:

MEDIO:	N	1	2	3
CONC. p.p.m.:	0	10	100	1000

Se prepararon 250 ml. de cada concentración, y se los pasó a Erlenmeyer de 1000 ml. donde se los esterilizó a  $110^\circ$  durante 30 min. Dichos frascos fueron sembrados con 1 ml. de un cultivo en medio de Wickerham de la levadura a estudiar.

A intervalos regulares se sacaron muestras de cada frasco con pipeta estéril, procediendo con ellas de acuerdo con el método para dosaje de azúcares de Stiles, Peterson y Fred (107). Los valores de estas determinaciones se han consignado en las tablas III-IX, y con ellos se han construido los gráficos 1-7. El método es de fácil realización y sus resultados son concordantes; la única dificultad aparece en la toma de muestra de los frascos que están en la fase más activa de la fermentación, ya que en la pipeta aparecen burbujas de  $CO_2$  que son una causa de error no evitable.

El significado de los encabezamientos de las tablas es el siguiente:

**DIA:**

**HORA:**

**EDAD:** horas a partir de la inoculación con 1 ml. de cultivo de lavadura.

**TESTIGO:** valores de la titulación con el reactivo sólo.

**LEIDO:** valores para la titulación de la muestra; los dos valores son a partir de alícuotas de un mismo clarificado.

**PROM.:** de los valores anteriores.

diferencia entre la titulación del blanco y la muestra; corresponde al azúcar reductor presente.

**VOL. CLARIF.:** volumen del clarificado que ha sido tomado para la determinación.

**GLUCOSA mg. l ml/:** valores del contenido en glucosa obtenidos a partir de la tabla del método.

**GLUCOSA % RESIDUAL:** valores obtenidos tomando la concentración de glucosa al momento de la inoculación como valor 100; se observará que el contenido inicial de glucosa no es exactamente el mismo para las distintas concentraciones de una misma serie de medios, lo cual se debe al volumen pequeño pero variable de agua usada para disolver el 2,4-D.

En los gráficos se han representado porcentajes de azúcar remanente en función del tiempo en horas.

Se realizaron ensayos de tres tipos diferentes, a saber:

**I) - DIFERENTES ESPECIES CON UN MISMO HERBICIDA**

Se ensayó la acción de un mismo inhibidor, la sal sódica del 2,4-D, sobre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ( tabla III, gráfico 1), *Saccharomyces carlsbergensis* ( tabla VII, gráfico 5), *Torulopsis utilis* ( tabla VIII, gráfico 6), y *Torula utilis* ( tabla IX, gráfico 7). En todos los casos puede constatarse: a)- hay desarrollo de levadura a cualquier concentración del inhibidor empleada, si bien a 1000 p.p.m. el desarrollo es apreciablemente menor. b)- la desaparición del azúcar es progresivamente más lenta al aumentar la concentración del herbicida desde 0 a 100 p.p.m., pero en todos los casos el azúcar desaparece en su totalidad y la diferencia de velocidad respecto del medio normal es muy poco marcada; la tabla que figura a continuación expresa en que porcentaje de tiempo excede la fermentación del medio que contiene 100 p.p.m. a la del testigo, tomando el tiempo de este último como valor 100:

**TABLA I**

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	22
<i>Torulopsis utilis</i>	20
<i>Torula utilis</i>	15

c)- en el medio que contiene 1000 p.p.m. la fermentación es lenta al principio, y finalmente se detiene del todo, llegando a un valor residual de azúcar que ya no varía con el tiempo, y que para las especies y condiciones usadas fué el siguiente:

TABLA XI

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	60
<i>Torulopsis utilis</i>	67
<i>Torula utilis</i>	85

II) - IGUAL ESPECIE CON DIFERENTE HERBICIDA:

Se ensayó la acción de dos formas distintas del 2,4-D, a saber: la sal sódica y el éster isopropílico sobre *Saccharomyces cerevisiae*. La diferencia realmente notable es de que en presencia de éster, y salvo la presencia de un período inicial de inducción, para la concentración de 1000 p.p.m., se llega en todos los casos a una degradación total del azúcar del medio. Posiblemente se deba ésto a una baja capacidad de penetración del éster a través de la membrana celular de la levadura, lo cual sumado a la poca sensibilidad inherente a los microorganismos hace que el éster aún a esta alta concentración resulte tan poco activo.

III)- ADAPTACION DE UNA LEVADURA A LA ACCION HERBICIDA:

Se ensayó si era factible lograr una adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* al 2,4-D ( tablas III, IV, V; gráficos 1,2,3 ). Para lograrlo se hicieron repiques sucesivos sobre un medio de agar de mosto de malta, que contenía 1000 p.p.m. de sal sódica de 2,4-D . Al cabo de 5 y de 10 repiques se construyeron las curvas de fermentación correspondientes, de las cuales se deduce: a)- por repiques sucesivos en medio con inhibidor, la levadura pierde algo de su poder fermentati-

vo, en el sentido de que medios con iguales cantidades de inhibidor tardan mayor tiempo en ser degradados. En la tabla siguiente se dan los tiempos para la degradación total de medios con 0 a 100 p.p.m. de sal sódica del 2,4-D; el valor 100 corresponde al medio testigo con levadura normal:

TABLA XII

CONCENTRACION	0	10	100
REPIQUES			
0	100	109	117
5	137	148	154
10	160	166	224

b)- a la concentración de 1000 p.p.m., la fermentación se hace también más lenta, y se llega también a un estado estacionario, pero la cantidad de azúcar que la levadura llega a fermentar es bastante mayor; el cuadro siguiente registra los porcentajes finales para los casos estudiados, expresados como porcentajes de azúcar inicial:

TABLA XIII

<u>REPIQUES</u>	<u>% REMANENTE</u>	<u>% FERMENTADO</u>
0	66	34
5	56	44
10	33	67

De las experiencias precedentes puede comprobarse el muy escaso efecto de este tipo de herbicidas sobre hongos y levaduras. Si

recordamos la explicación que se dió sobre el mecanismo más probable de la acción herbicida de los arilexiacéticos (118) veremos que este resultado es el más lógico y razonable; en efecto, los organismos estudiados, unicelulares en el caso de las levaduras, o en forma de asociaciones celulares bastante sencillas para el caso de los mohos, carecen de puntos definidos de crecimiento como las yemas y ápices de raíces de los vegetales superiores y en los cuales se localiza la mayor parte de la acción herbicida; asimismo ninguno de estos organismos posee un sistema vascular especializado que puede sufrir lesiones. Como la muerte es un efecto secundario debido a las alteraciones primarias que el herbicida produce en el vegetal, no existiendo éstas, no habrá muerte.

Por otra parte hemos visto que los arilexiacéticos son capaces de afectar positiva - o negativamente algunos de los sistemas hormonales que existen en el vegetal; la inhibición del poder fermentativo a altas concentraciones de herbicida puede deberse a ello.





2 % GLUCOSA

DIA: 3/11      HORA: 8,30

DIA	HOR	CONCENTRACION: 1000 p.p.m.					glucosa % resid.
		efdo	prom.	△	vol. clarif.	glucosa mg/ml.	
3/11	8,36,10 6,12	6,11	12,92	1	1,767	100	
"	18,36,32 5,98	6,15	12,94	1	1,762	98,8	
4/11	8,37,55 7,58	7,54	11,55	1	1,585	89,7	
"	14,07,87 7,82	7,85	11,24	1	1,551	87,8	
"	19,08,77 8,77	8,77	10,32	1	1,448	82,0	
5/11	8,30,23 0,11	10,17	8,92	1	1,265	71,6	
"	18,30,50 0,44	10,47	8,62	1	1,226	69,4	
6/11	8,30,86 0,78	10,82	8,27	1	1,182	66,9	
7/11	8,30,81 0,89	10,85	8,24	1	1,178	66,8	
10/11	8,31,08 1,06	11,07	8,02	1	1,148	65,0	

**LEVADURA: SACCHAROMYCES CEREVISIAE (1)**

**INOCULO: Cantidad: 1 ml**

DIA	HORA	EDAD	TESTIGO		CONCENTRACION: 0 (medio normal) Nº N						COM Nº
			leí- do	prom. gen.	leí- do	prom.	△	vel. clar.	gluc. ga/gl	gluc. % res.	
17/11	9	0	18,85 18,95		5,97 5,89	5,93	13,07	1	1,780	100	6,04 5,96
"	18,30	9,30	19,00 19,05		6,03 0,07	6,05	12,95	1	1,763	99,1	6,24 6,24
18/11	8,30	23,30	19,04 19,18		6,56 6,54	6,55	12,45	1	1,694	95,2	6,67 6,42
"	14,00	29,00	19,21 18,97		7,91 7,81	7,86	11,14	1	1,540	86,5	6,95 7,14
"	18,00	33,00	19,02 19,03		9,27 9,33	9,30	9,70	1	1,368	76,8	7,80 7,76
19/11	8,30	47,30	19,10 19,13		18,45 18,31	18,38	0,62	2	0,064	3,6	9,00 8,96
"	14,00	53,00	19,15 19,00		18,92 18,86	18,89	0,11	2	-	-	17,61 17,59
"	18,00	57,00	18,95 19,01								19,07 18,96
20/11	9,00	72,00	18,95 18,99								
21/11	9,00	96,00	18,85 19,00								
24/11	9,00	168	18,95 18,95								

(1) 5 generaciones en 2,4- D



2 % GLUCOSA

DIA: 17

HORA: 9

DIA	CONCENTRACION: 1000 p.p.m. Nº 3					
	[do	prom.	△	vol. clarif.	glucosa mg/ml.	glucosa % resid.
17/11	15 15	6,15	12,85	1	1,789	100
"	187 25	6,31	12,69	1	1,727	98,7
18/11	83 92	6,36	12,63	1	1,717	98,1
"	90 14 54	7,51	11,83	1	1,616	92,3
"	102 86	6,94	12,06	1	1,644	94,0
19/11	89 55	9,57	9,43	1	1,330	78,1
"	148 50	9,63	9,37	1	1,322	75,6
"	180 96	9,98	9,02	1	1,278	73,0
20/11	91 83	10,87	8,13	1	1,163	66,8
21/11	97 35	11,64	7,36	1	1,056	60,3
24/11	930 32	12,26	6,74	1	0,974	55,7





2 % GLUCOSA

DIA: 16/12      HORA: 8,30

DIA	H	CONCENTRACION: 1000 p.p.m. NR 3					
		leído	prom.	△	vol. clarif.	glucosa mg/ml.	glucosa % resid.
16/12	8,	6,85 6,75	6,80	12,1	1	1,649	100
"	14,						
"	18,	6,91 6,89	6,90	12,00	1	1,636	99,3
17/12	8,	7,11 6,89	7,00	11,90	1	1,624	98,3
"	18,	7,07 7,05	7,06	11,84	1	1,617	98,1
18/12	8,	8,92 8,78	8,85	10,05	1	1,418	86,0
"	14,	9,78 9,78	9,78	9,12	1	1,290	78,2
"	18,	10,02 9,98	10,00	8,90	1	1,262	76,5
19/12	8,	12,25 12,35	12,30	6,60	1	0,955	57,8
"	14,	12,61 12,43	12,52	6,38	1	0,923	55,9
"	18,	13,14 13,06	13,10	5,80	1	0,852	51,7
22/12	15,	15,41 15,35	15,38	3,82	1	0,548	33,2



MEDIO: WICKERHAM

EDAD: 60 horas

ERACION: 10 p.p.m. (')					CONCENTRACION: 100 p.p.m. (')					
					Nº 8					
prom.	Δ	vol. clar.	gluc. mg/ml.	gluc. % res.	le-f-do	prom.	Δ	vol. clar.	gluc. mg/ml.	gluc. % res.
6,27	12,71	1	1,730	100	6,19 6,21	6,20	12,78	1	1,740	100
6,28	12,70	1	1,728	99,9	6,00 6,10	6,05	12,93	1	1,760	101,2
6,40	12,58	1	1,710	98,8	6,31 6,19	6,25	12,73	1	1,732	99,6
11,30	7,68	1	1,100	63,6	10,02 9,84	9,93	9,05	1	1,282	73,7
10,54	8,44	2	0,602	34,8	9,20 9,14	9,17	9,81	2	0,692	39,8
18,60	0,38	2	0,041	2,4	16,94 17,06	17,00	1,98	2	0,171	9,8
19,09	-0,11	2	-	-	18,90 18,64	18,77	0,21	-	-	-

(') Ester isopropilico del 2,4-D, (Esteron 44, Dow) equivalente

2 % GLUCOSA

DIA: 2/12

HORA: 8,30

DIA	H	CONCENTRACION: 1000 p.p.m. (')					glucosa % resid.
		leído	prom.	△	vol. clarif.	glucosa mg/ml.	
2/12	1	6,36	6,33	12,65	1	1,720	100
		6,30					
"	1	6,51	6,45	12,53	1	1,705	99,1
		6,32					
"	1	6,21	6,18	12,80	1	1,742	101,4
		6,15					
3/12	1	6,38	6,38	12,60	1	1,713	99,7
		6,38					
"	1	6,47	6,40	12,58	1	1,712	99,5
		6,33					
"	1	6,51	6,48	12,50	1	1,700	98,8
		6,45					
4/12	1	9,82	9,88	9,10	1	1,288	74,9
		9,94					
"	1	12,74	12,67	6,31	1	0,913	53,1
		12,60					
"	1	18,08	18,11	0,87	1	0,169	9,8
		18,14					
5/12	1	18,87	18,81	0,17	2	-	-
		18,75					

en cada caso a la cantidad indicada de sal sódica de 2,4-D





2 % GLUCOSA

DIA: 12/11

HORA: 8,30

DIA		CONCENTRACION: 1000 p.p.m. Nº 3			
	leído	prom.	vol. clarif.	glucosa mg/ml.	glucosa % resid.
12/11	6,20 6,18	6,19	1	1,754	100
"			1		
"	6,20 6,16	6,23	1	1,747	99,6
13/11	6,60 6,80	6,70	1	1,633	95,9
"	7,15 7,19	7,17	1	1,624	92,6
"	7,30 7,24	7,27	1	1,613	91,8
14/11	9,21 9,21	9,21	1	1,391	79,3
"	9,54 9,64	9,59	1	1,336	76,2
"	9,71 9,83	9,77	1	1,313	74,8
17/11	1,88 1,86	11,87	1	1,036	59,1
18/11	1,80 1,80	11,80	1	1,045	59,6





2 % GLUCOSA

DIA: 27/10

HORA: 8,30

DIA	CONCENTRACION: 1000 p.p.m. N° 3					
	leído	prom.	△	vol. clarif.	glucosa mg/ml	glucosa % resid.
27/10	8 7,26 7,29	7,25	11,90	1	1,694	100
"	14 7,19 7,01	7,10	12,05	1	1,643	101,1
"	18 7,44 7,38	7,41	11,74	1	1,606	98,8
28/10	8 7,61 7,57	7,59	11,56	1	1,586	97,6
"	14 8,25 8,25	8,25	10,90	1	1,513	93,2
"	18 8,50 8,32	8,41	10,74	1	1,495	92,0
29/10	8 10,07 9,91	9,99	9,16	1	1,295	79,7
"	14 10,26 10,16	10,21	8,94	1	1,267	78,0
"	18 10,24 10,32	10,28	8,87	1	1,258	77,4
30/10	8 11,19 11,21	11,20	7,95	1	1,138	70,1
"	15 11,62	11,62	7,53	1	1,078	66,3
31/10	8 11,26 11,24	11,25	7,90	1	1,130	69,6
"	18 11,36	11,36	7,79	1	1,114	68,5
3/11	8 11,55 11,43	11,49	7,66	1	1,097	67,5

LEVADURA: TORULA UTILIS

VOL. INOCULO: 1 ml.

DIA	HORA	EDAD	TESTIGO		CONCENTRACION: 0 p.p.m. medio normal Nº N						CO Nº
			leí- do	prom. gen.	leí- do	prom.	△ vel. clar.	gluc. mg/ml/	gluc. % res.	leí- do	
9/12	8,30	0	18,90 18,93		6,96 6,90	6,88	12,05	1	1,642	100	6 6
"	14,30	5,30	18,97 18,87		6,98 6,82	6,90	12,03	1	1,640	99,8	6 6
10/12	8,30	24	18,98 18,90		8,01 7,79	7,90	11,33	1	1,527	93,0	7 7
"	14,30	29,30	18,86 19,05		9,17 9,15	9,16	9,77	1	1,378	84,0	8 8
"	18,30	34	18,95 18,96		8,71 8,91	8,81	9,12	1	1,290	78,6	9 9
11/12	8,30	48	18,95 18,85		15,41 15,33	15,37	3,56	1	0,553	33,7	13 13
"	15.00	54,30	18,92 18,83		18,39 18,73	18,56	0,37	2	0,040	2,5	15 15
11/12	18,30	58	18,96 18,91		18,90 19,36	19,13	0,20	2	-	-	18 18
12/12	8,30	72	19,00 19,15								
"	18,30	82	18,90 18,93								
15/12	8,30	144	18,86 18,93								

18,93 ml.

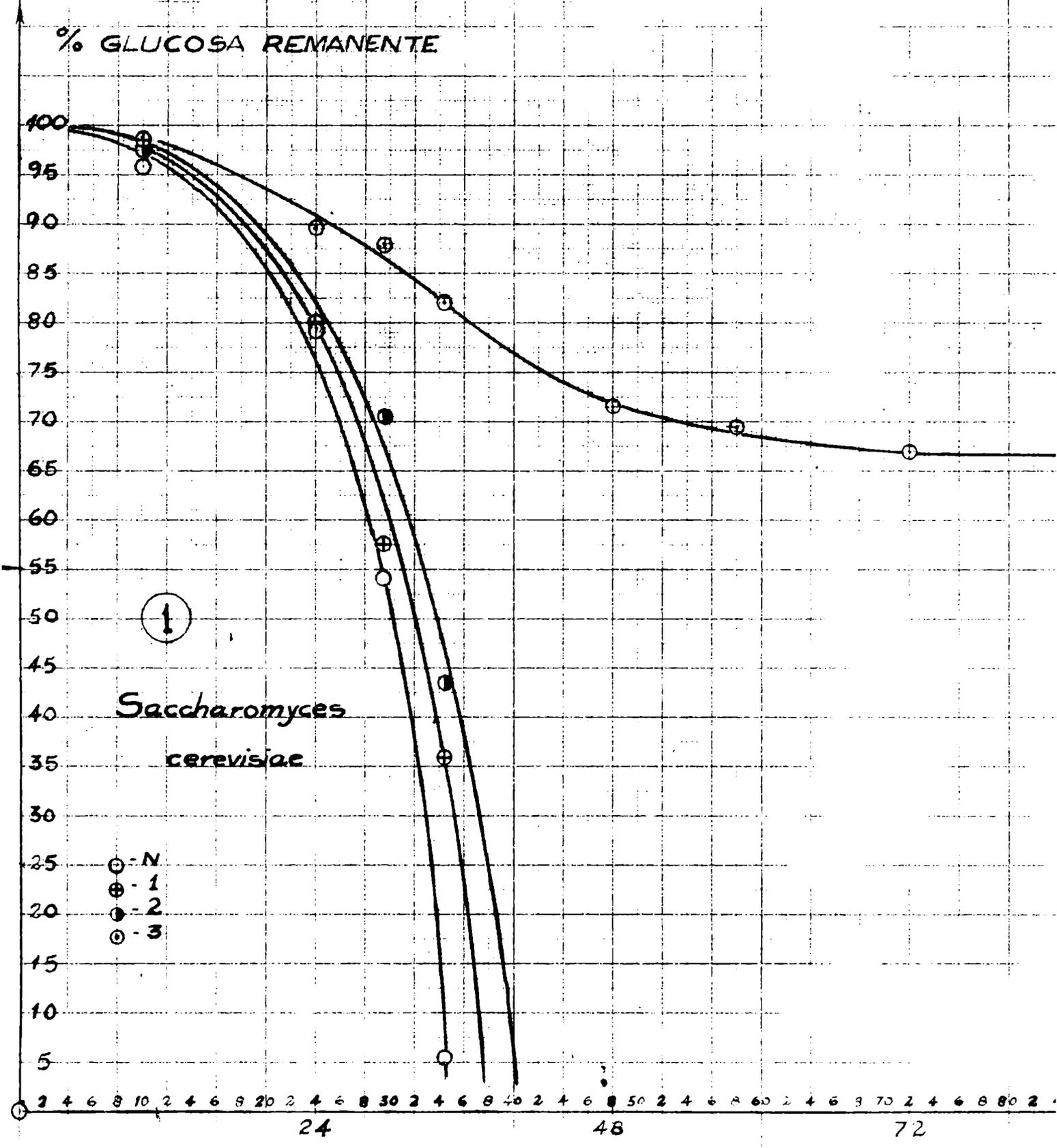


2 % GLUCOSA

DIA: 9/12      HORA: 8,30

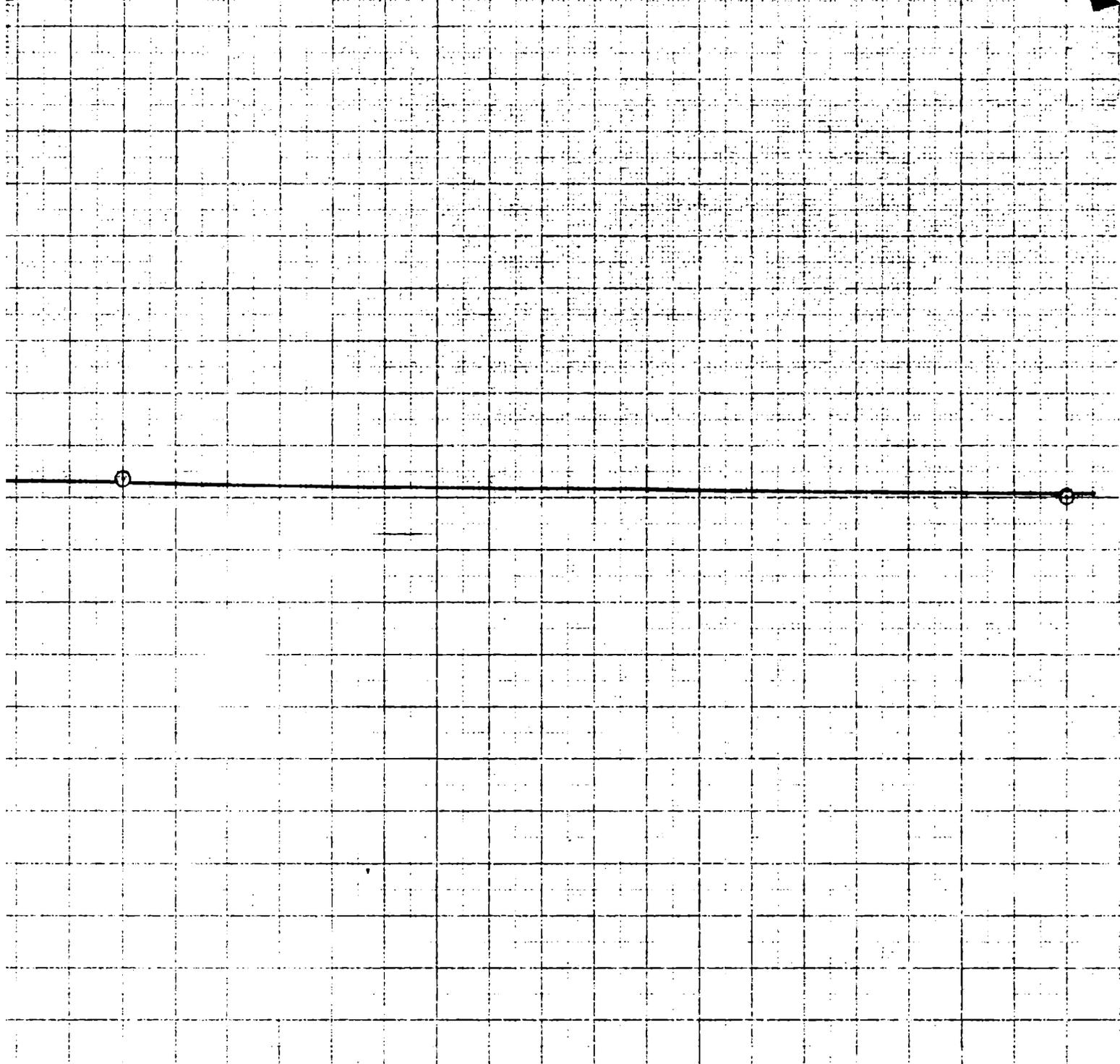
DIA		CONCENTRACION: 1000 p.p.m. Nº 3				
	Ido	prom.	$\Delta$	vel.clarif.	glucosa mg/ml.	glucosa % resid.
9/12	09 05	7,07	11,86	1	1,620	100
"		-	-	1	-	-
10/12	39 51	7,45	11,48	1	1,578	97,5
"	98 40	8,19	10,74	1	1,495	92,3
"	42 40	8,41	10,52	1	1,472	90,8
11/12	20 04	9,12	9,81	1	1,383	85,4
"	10 02	9,06	9,87	1	1,393	86,0
11/12	16 16	9,16	9,77	1	1,378	85,0
12/12	16 48	9,32	9,61	1	1,356	83,7
"	23 17	9,20	9,73	1	1,372	84,8
15/12	15 09	9,12	9,81	1	1,383	85,4

% GLUCOSA REMANENTE



Saccharomyces  
cerevisiae

- - N
- ⊕ - 1
- - 2
- - 3



TIEMPO (horas)

90 2 4 6 8 100 2 4 6 8 10 2 4 6 8 20 2 4 6 8 30 2 4 6 8 40 2 4 6 8 50 2 4 6 8 60 2 4 6 8

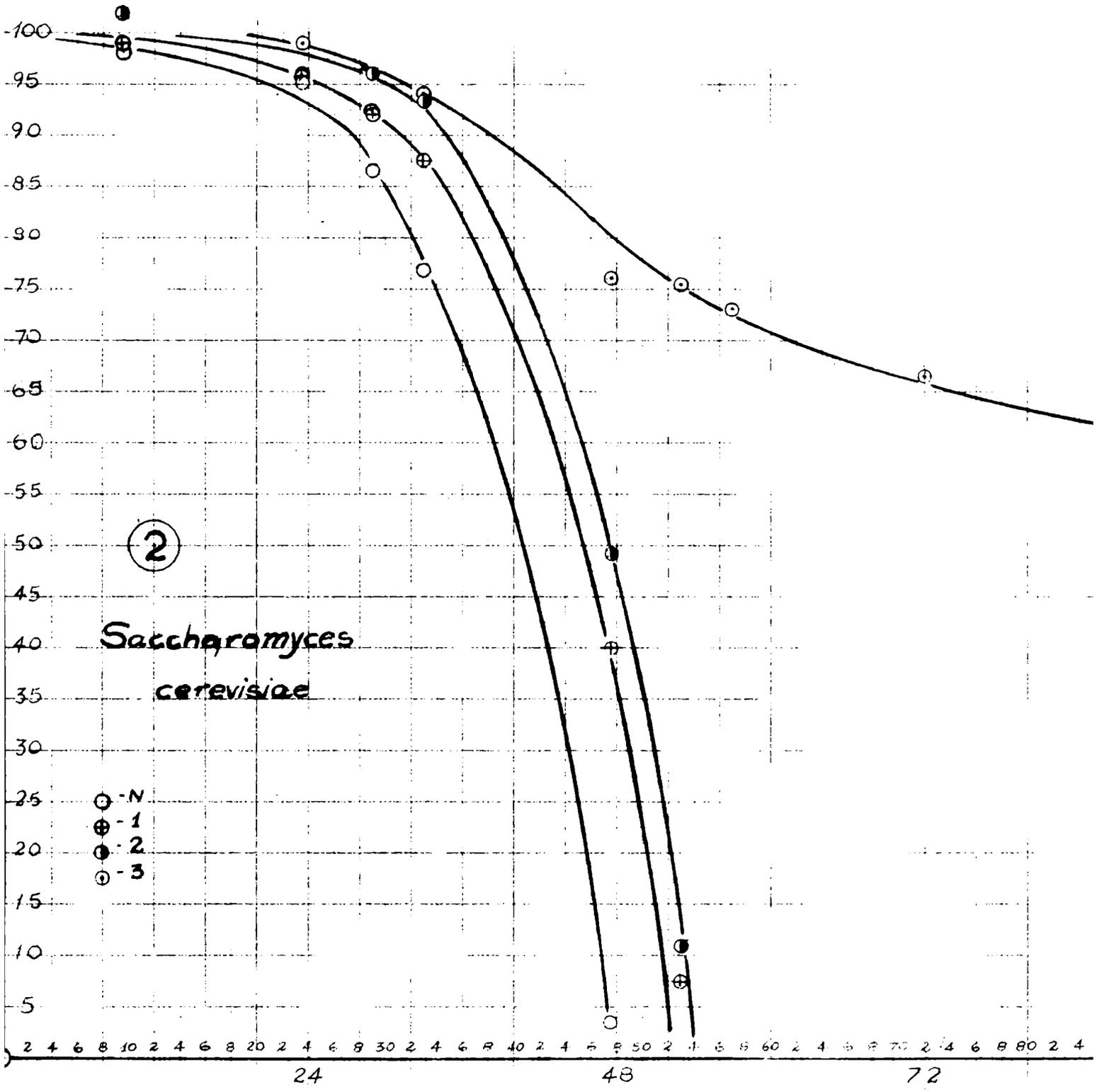
96

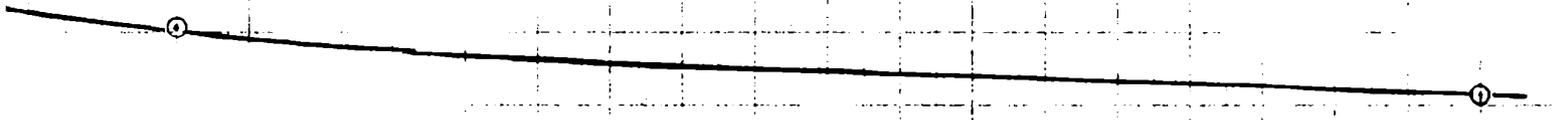
120

144

168

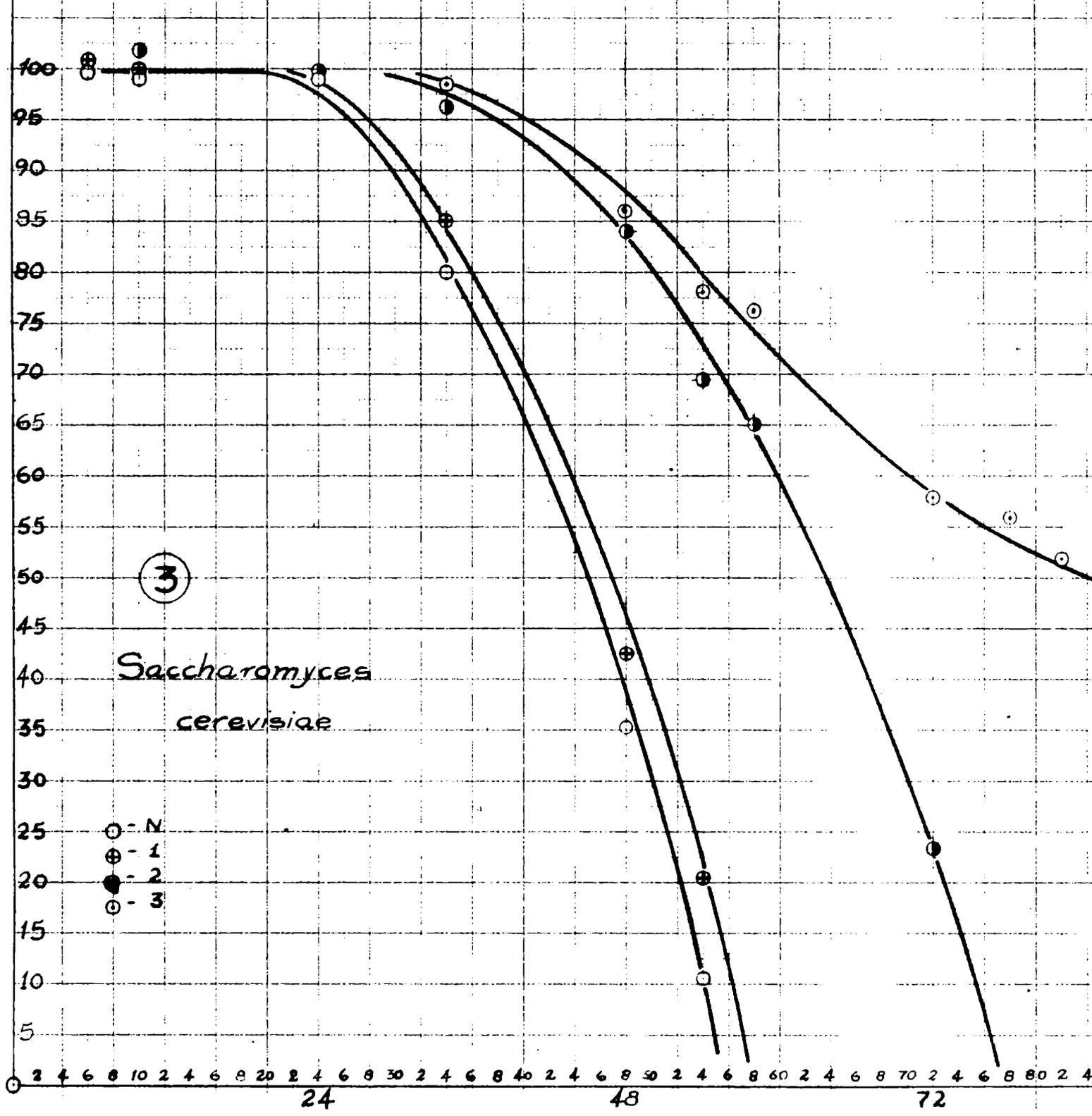
% GLUCOSA REMANENTE

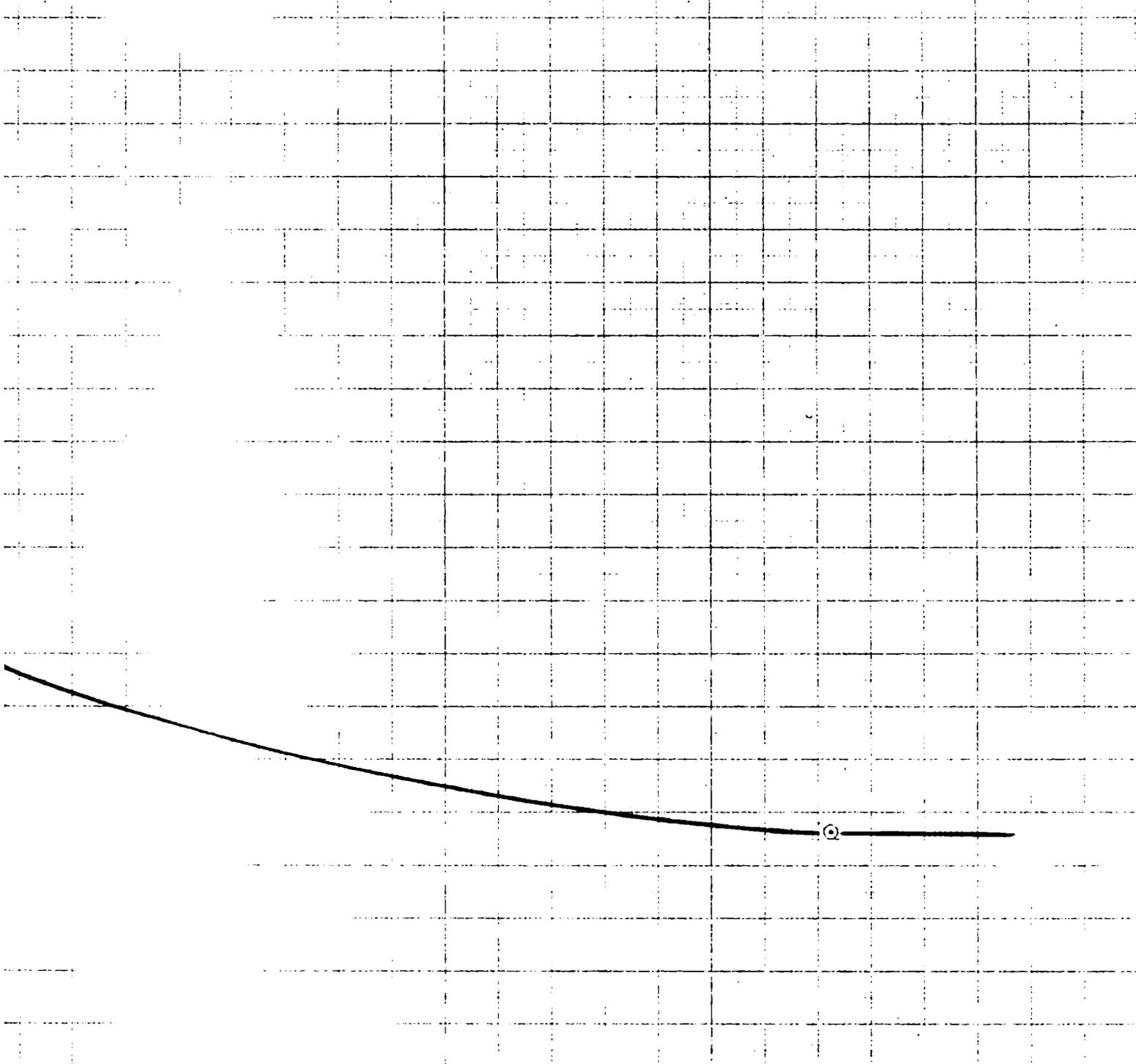




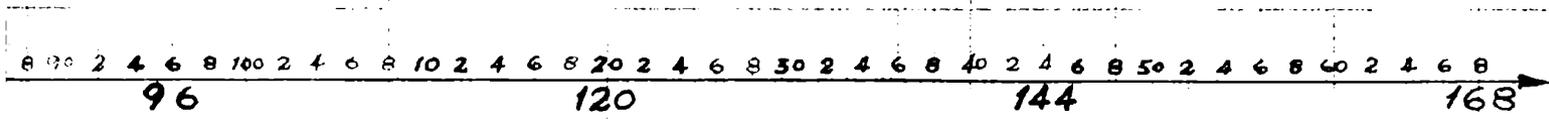
8 90 2 4 6 8 100 2 4 6 8 10 2 4 6 8 20 2 4 6 8 30 2 4 6 8 40 2 4 6 8 50 2 4 6 8 60 2 4 6 8  
96 120 144 168

# % GLUCOSA REMANENTE

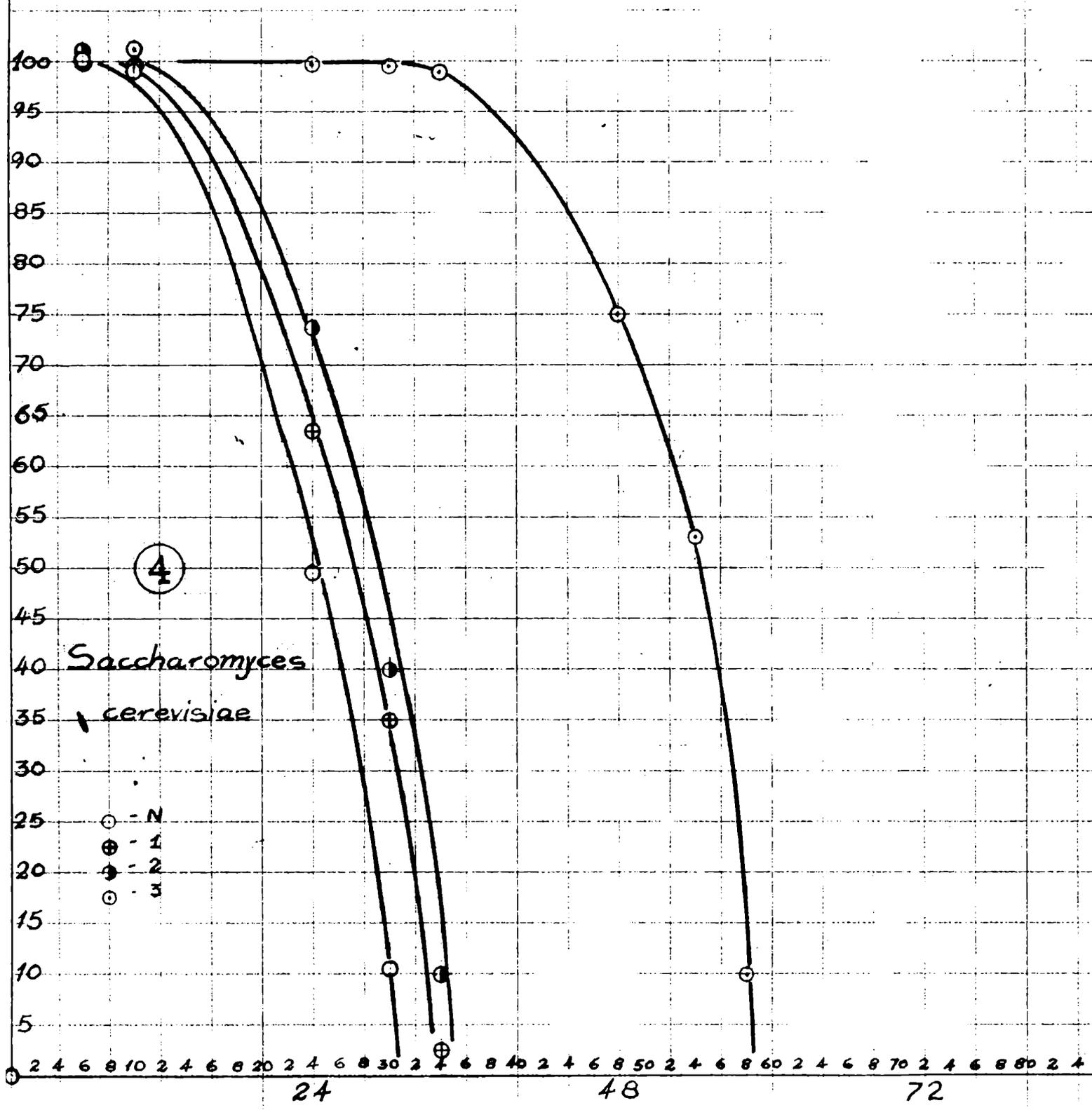




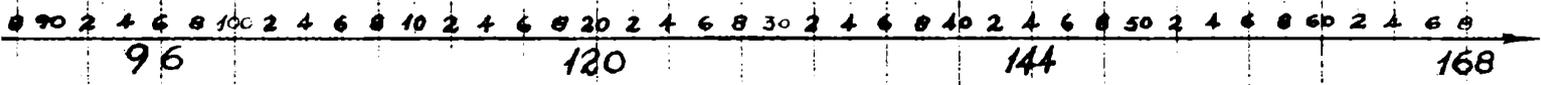
TIEMPO (horas)



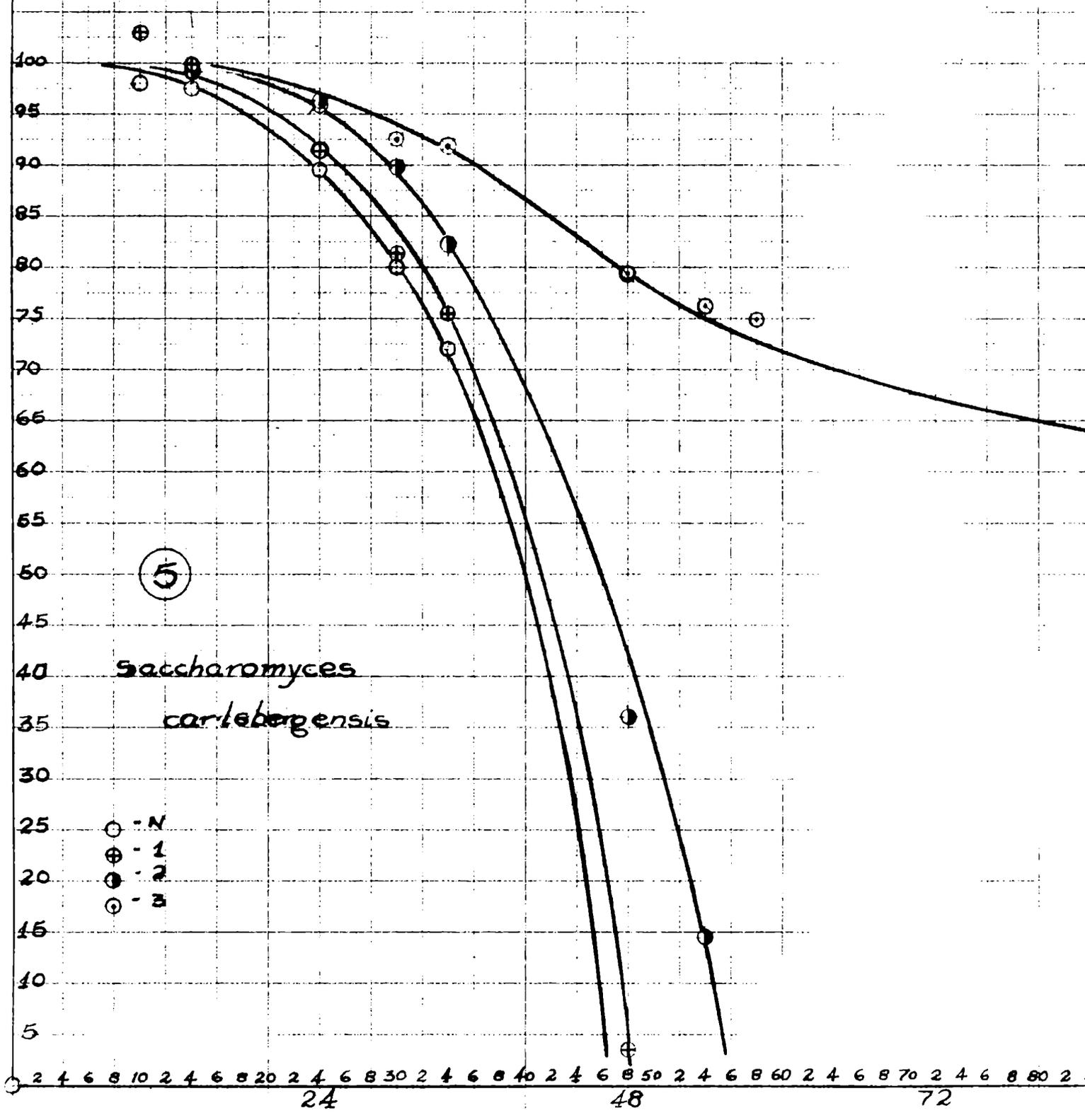
% GLUCOSA REMANENTE



TIEMPO (horas)



% GLUCOSA REMANENTE

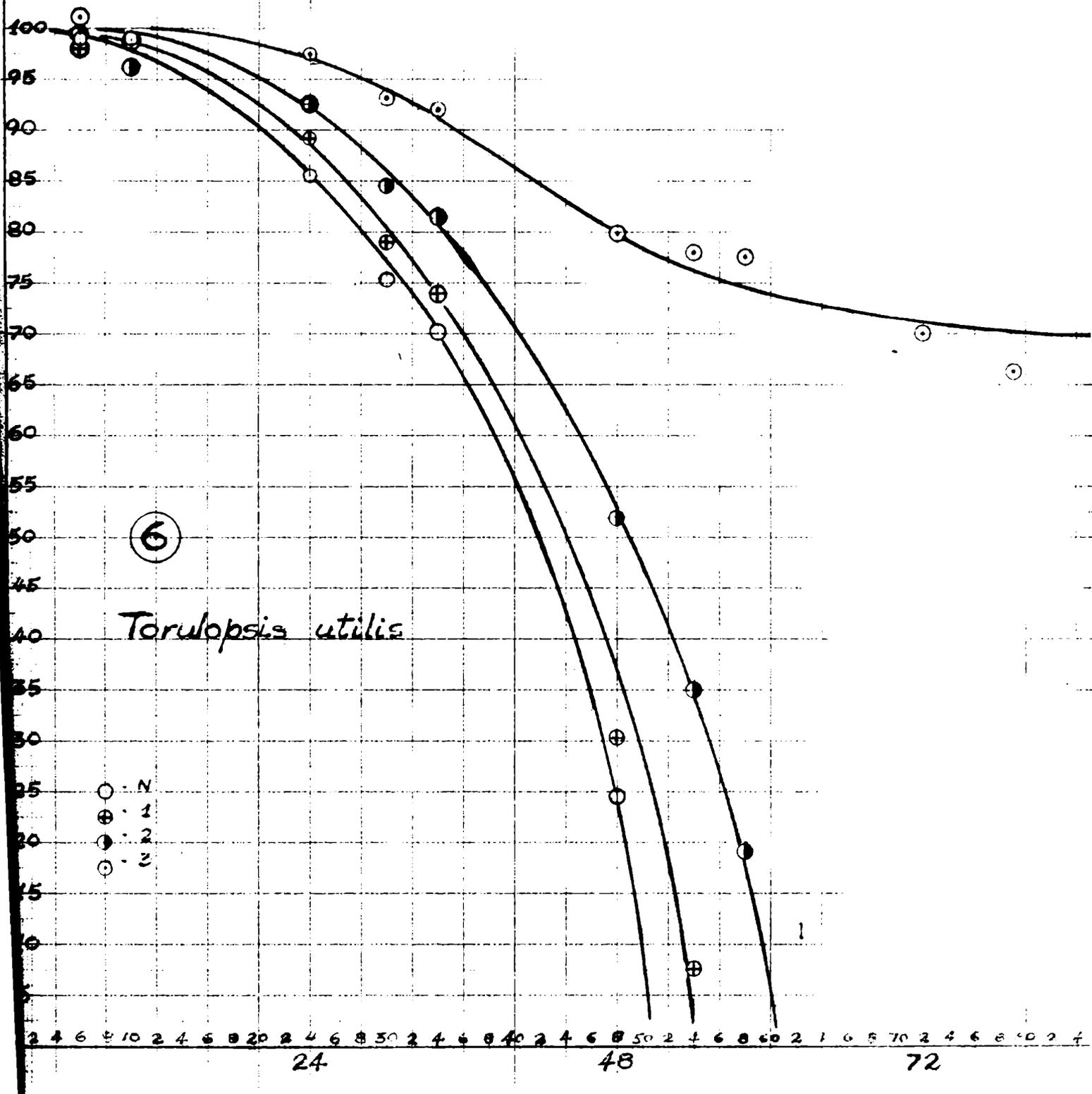




TIEMPO (horas)

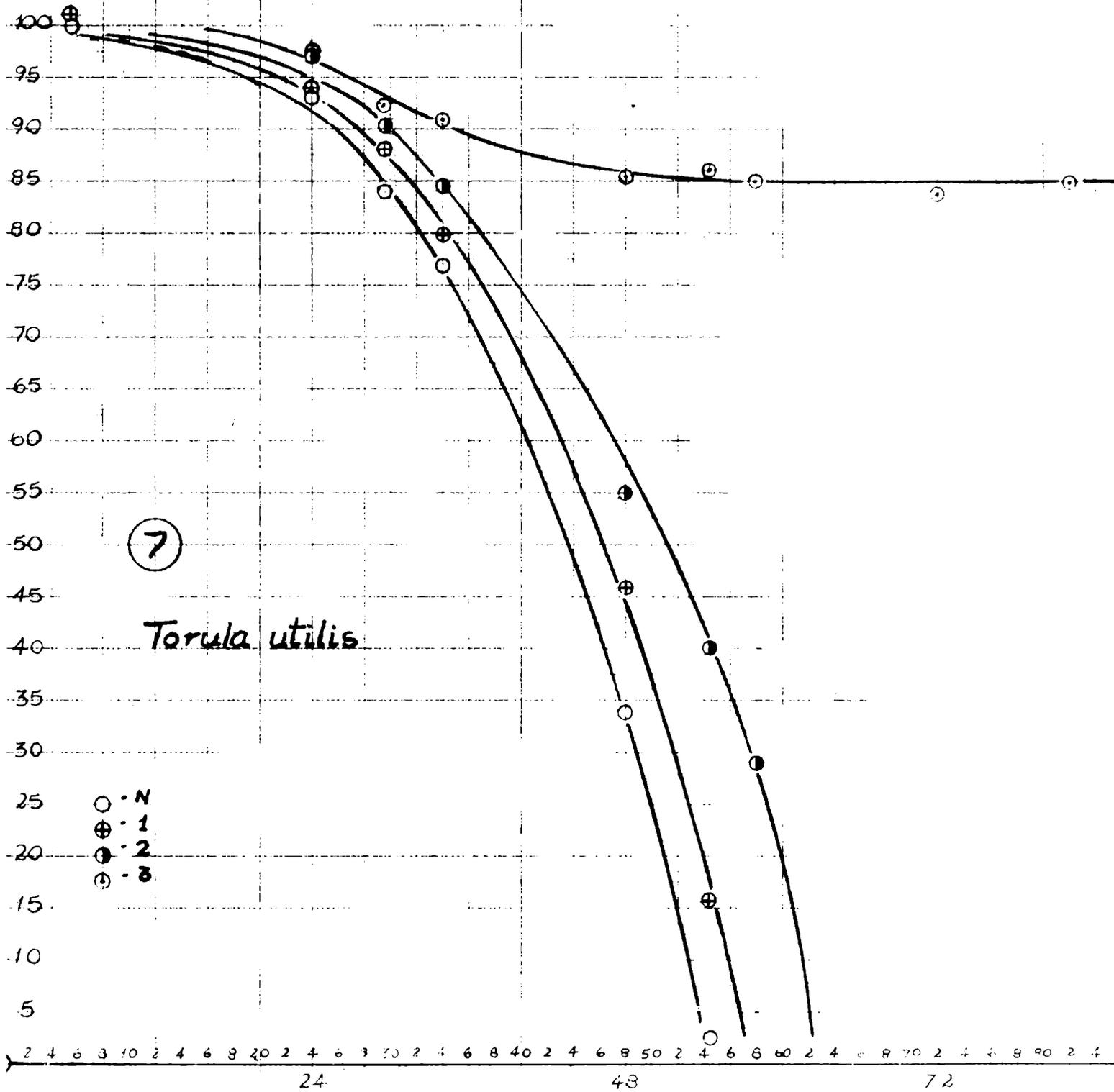
8 90 2 4 6 8 100 2 4 6 8 10 2 4 6 8 120 2 4 6 8 30 2 4 6 8 40 2 4 6 8 50 2 4 6 8 60 2 4 6 8 168

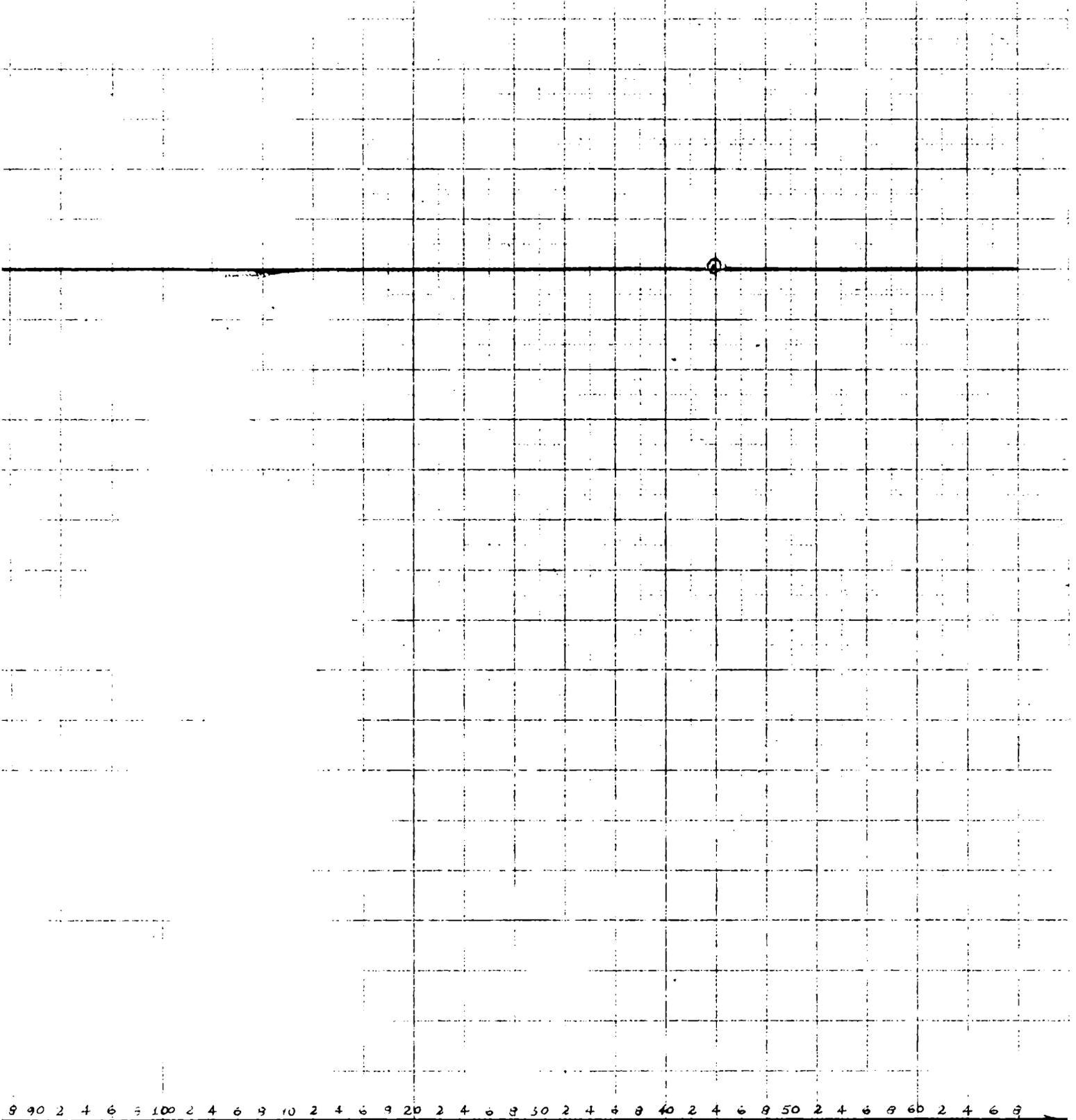
% GLUCOSA REMANENTE





% GLUCOSA REMANENTE





9 90 2 4 6 8 100 2 4 6 8 10 2 4 6 8 20 2 4 6 8 30 2 4 6 8 40 2 4 6 8 50 2 4 6 8 60 2 4 6 8

96

120

144

168

CONCLUSIONES

- I) - Se estudió la bibliografía referente a herbicidas selectivos, y se hizo una reseña del conocimiento actual, con especial referencia a los del tipo ariloxiacético, y su mecanismo de acción, como asimismo todo lo referente a la acción de los herbicidas sobre microorganismos.
- II) - Se desarrollaron dos métodos para la evaluación cuantitativa del efecto de herbicidas sobre microorganismos.
- III) - Se aplicaron dichos métodos a hongos del género *Aspergillus* y a cuatro especies de levaduras de importancia económica.
- IV) - Se confirmó en general lo que indica la escasa bibliografía que hay sobre este tema, o sea un efecto muy moderado de los ariloxiacéticos sobre hongos y levaduras, no observándose una fitotoxicidad manifiesta aún a las mayores concentraciones usadas.
- V) - A altas concentraciones del inhibidor se afecta el poder fermentativo de las levaduras, las cuales no son ya capaces de consumir la totalidad del azúcar del sustrato.
- VI) - El repique del organismo en un medio con herbicida, parece llevar a una adaptación a éste, si bien la levadura pierde capacidad fermentativa.
- VII) - De las experiencias efectuadas, y de la bibliografía existente, se deduce que las concentraciones de herbicida usadas con fines agrícolas difícilmente pueden modificar la microflora del suelo.

VIII) - Por último, como ya se vió, los resultados hallados están de acuerdo con las ideas actuales sobre el mecanismo de acción de los ariloxiacéticos.

VI - BIBLIOGRAFIA

- (1) ABERG, B. - Arkiv Kemi 3, 549 (1951)
- (2) ALDRICH, R.J. - Ag. Food Chem. 1, 257 (1953)
- (3) AUDUS, L.J. y QUASTEL, J.H., Nature 159, 320 (1947)
- (4) AUDUS, L.J. - Plant and Soil 2, 31 (1949)
- (5) AUDUS, L.J. - Plant and Soil 3, 170 (1951)
- (6) AUDUS, L.J.- J. Sci. Food Agr. 3, 268 (1952)
- (7) BARRONS, K.C.- Agr. Food Chem. 1, 45 (1953)
- (8) BATJER, L.P. - y THOMPSON, A.H., Proc. Am. Soc. Hort.Sci. 47, 35  
(1946)
- (9) BATJER, L.P. y THOMPSON, A.H., Proc. Am. Soc. Hort.Sci. 49, 45  
(1947)
- (10) BATJER, L.P., THOMPSON, A.H. y GERHARDT, F. - Proc. Am. Soc. Hort.  
Sci. 51, 71 (1948)
- (11) BAUSOR, S.C., Botan. Gaz. 104, 115 (1942)
- (12) BEATTY, R.H., Agr. Food Chem. 1, 178 (1953)
- (13) BEVER W.M. y SLIFE, F.W., Phytopathology 38, 1038 (1948)
- (14) BLONDEAU, R. y CRANE, J.C., Science 108, 719 (1948)
- (15) BRETZ, T.W., Plant Disease Repr. 28, 206 (1944)
- (16) BROWN, J.W., Botan. Gaz. 107, 332 (1946)
- (17) BROWN, J.W., y MITCHELL, J.W., Botan. Gaz. 102, 314 (1948)
- (18) CARYLE, R.E. y THORPE, J.D., J. Am. Soc. Agron. 39, 929 (1947)
- (19) CHADWICK, L.C., MILLER, R.R., y ERSKINE, D., Proc. Am. Soc. Hort.  
Sci., 58, 308 (1951)
- (20) CHOWDHURY, H.P. y KAMAL, M., Current Sci. (India) 19, 247 (1950)
- (21) CIFERRI, R., Notiz. Malattie Piante 9, 44 (1950)
- (22) CRAFTS, A.S. y HARVEY, W.A., Agr. Chemicals 5, No 3, 38 (1950)
- (23) CRAFTS, A.S., Agr. Food Chem. 1, 51 (1953)

- (24) CROCKER, W., Growth of Plants, (Reinhold 1948)
- (25) CULLER, D., WEISER, H. y WITMAN, E.D., Food Research **13**, 482 (1948)
- (26) DUBOS, R.J., Rockefeller Inst. Exptl. Biol. Med. **63**, 317 (1946)
- (27) EAMES, A.J., Am. J. Botany, **37**, 840 (1950)
- (28) EDGERTON, L.J. y HOFFMAN, M.B., Proc. Am. Soc. Hort Sci. **51**, 67 (1948)
- (29) EDGERTON, L.J., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **42**, 42 (1947)
- (30) ERICKSON, L.C. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **58**, 53 (1951)
- (31) ERICKSON, L.C., SEELY, C.I. y KLAGES, K.H., J. Am. Soc. Agron. **40**, 659 (1948)
- (32) FREAR, D.E.H., Agricultural Chemistry, 2 vol. Van Nostrand (1950)
- (33) FREED, V.H., Agr. Food Chem., **1**, 47 (1953)
- (34) FULTS, J.L. y PAYNE, M.G., J. Am. Soc. Agron. **32**, 667 (1947)
- (35) FULTS, J.L. y PAYNE, M.G., Am. J. Botany, **34**, 245 (1947)
- (36) GARBER R.H., SCHAAL, L.A. y FULTS, J.L., Phytopathology, **41**, 991 (1951)
- (37) GOLDACRE, P.L., Australian J. Sci. Research (B) **2**, 154 (1949)
- (38) GUISCAFRE-ARRILLAGA, J., Plant Disease Rptr. **32**, 248 (1948)
- (39) HAMNER, C.L. y TUKEY, H.B., Botan. Gaz. **106**, 232 (1944)
- (40) HARLEY, C.P., MOON, H.H., REGEIMBAL, O.L. y GREEN, E.L., Proc. Am. Soc. Hort. Sci., **47**, 39 (1946)
- (41) HARLEY, C.P., MOON, H.H., y REGEIMBAL, O.L., Proc. Am. Soc. Hort. Sci., **50**, 38 (1947)
- (42) HITCHCOCK, A.E. y ZIMMERMAN, P.W., Contrib. Boyce Thompson Inst. **14**, 21 (1945).
- (43) HITCHCOCK, A.E. y ZIMMERMAN, P.W., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **45**, 187 (1944)
- (44) HOFFMANN, O.L. y SMITH, A.E., Science **109**, 588 (1949)
- (45) HOLLEY, R.W. Arch. Biochem. Biophys. **35**, 171 (1952)
- (46) HSUEH, Y.L. y LOU, C.H., Science **105**, 283 (1947)

# C. I. F. N. A.

- (47) IBRAHIM, I.A., *Phytopathology* 41, 951 (1951)
- (48) JASION, L.Z. y EBY, L.T., U.S. 2533015 Dic. 5, 1950
- (49) JENSEN, H.L. y PETERSEN, H.I., *Nature* 170, 39 (1952)
- (50) JONES, F.D., U.S. 2.394.916 Febr. 12, 1946
- (51) JONES, R.L., METCALFE, T.P. y SEXTON, W.A., *Biochem. J.* 45, 143 (1949)
- (52) JONES, R.L., METCALFE, T.P. y SEXTON, W.A., *Biochem. J.* 48, 422 (1951)
- (53) KELLY, J.A., *Agr. Food Chem.* 1, 254 (1953)
- (54) KESSLER, K.L. y ALLISON, J.R., *Calif. Citrograph* 24, 24 (1948)
- (55) KLINGMAN, G.C. y AHLGREN, G.H., *Botan. Gaz.* 113, 119 (1951)
- (56) KOEPFH, J.B., THIMANN, K.V. y WENT, F.W., *J. Biol. Chem.* 122, 163 (1938)
- (57) LEAPER, J.M.F. y BISHOP, J.R., *Botan. Gaz.* 112, 250 (1951)
- (58) LEWIS, R. W. y HAMNER, C.L., *Mich. Agr. Expt. Sta., Quart. Bull.* 29, 112 (1946)
- (59) LUECKE, R.W., HAMNER, C.L. y SELL, H.M., *Plant Physiol.* 24, 546 (1949)
- (60) MANIL, P. y STRAZEWSKA, Z., *Comp. rend. sec. biol.* 144, 313 (1950)
- (61) MARTH, P.C. y DAVIES, F.F., *Botan. Gaz.* 106, 463 (1945)
- (62) MARTH, P.C., HARLEY, C.P. y HAVIS, A.L., *Science* 111, 331 (1950)
- (63) Mc. NEW, G.L., y HOFFMANN, O.L., *Iowa State Coll. J. Sci.* 24, 189 (1950)
- (64) MARTIN, J.P., *Calif. Citrograph*, 31, 248.264 (1946)
- (65) Mc. CALL, G.L., *Agr. Chemicals* 7 N° 5, 40, 127 (1952)
- (66) Mc. KAY, J.F., YOWELL, H.L. y JASION, L.Z., U.S. 2.586.681 Febr. 19, 1952
- (67) MEHROTRA, B.S., *Univ. Allhabad. Current Sci. (India)* 20, 131 (1951)
- (68) MICHAELSON, M.E., SCHAAL, L.A. y FULTS, J.S., *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 13, 267 (1948)
- (69) MILBRATH, J.A. y HARTMAN, H., *Proc. Oregon State Hort. Soc.* 33 42 (1941)

- (70) MILLER I.H. y BURRIS, R.H., Am. J. Bot. 38, 547 (1951)
- (71) MINARICK, C.E., READY, D., NORMAN, A.G., THOMPSON, H.B. y OWINGS, J.F., Botan. Gaz. 113, 135 (1951)
- (72) MINARICK, C.E. y NORMAN, A.G., Agr. Food Chem. 1, 42 (1953)
- (73) MITCHELL, J.W. y MARTH, P.C., Botan. Gaz. 104, 199 (1944)
- (74) MITCHELL, J.W. y BROWN, J.W., Botan. Gaz. 107, 120 (1945)
- (75) MOON, H.H., REGEMBAL, L.O. y HARLEY, C.P., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 51, 75 (1948)
- (76) MURNEEK, A.E., WITTWER, S.H. y HEMPHILL, D.D., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 45, 371 (1944)
- (77) MURRAY, M.A. y WHITING, G., Botan. Gaz. 109, 13 (1947)
- (78) NORMAN, A.G., J. Am. Soc. Agron. 40, 111 (1948)
- (79) NUTMAN, P.S., THORTON, H.G. y QUASTEL, J.H., Nature 155, 498 (1945)
- (80) OKNENKO, A.S. y TABENISKI, D.A., Doklad y Akad. Nauk. S.S.S.R. 62, 541 (1948)
- (81) OSBORNE, D.J., WAIN, R.L. y WALKER, R.D., J. Hort. Sci. 27, 44 (1952)
- (82) OVERBEEK, J. van., Botan. Gaz. 108, 64 (1946)
- (83) OVERBEEK, J. van., Ann. Rev. Biochem. 13, 631 (1944)
- (84) OVERBEEK, J. van., BLONDEAU, R. y HORNE, V., Am. J. Bot. 38, 589 (1951)
- (85) OVERBEEK, J. van., BLONDEAU, R. y HORNE, V., Plant Physiol. 26, 687 (1951)
- (86) PAYNE, M.G. y FULTS, J.L., J. Am. Soc. Agron. 39, 52 (1947)
- (87) PRESCOTT, S.C. y DUNN, C.G., "Industrial Microbiology" 2<sup>a</sup> Ed., Mc Graw-Hill (1949)
- (88) RAVAZZONI, C., Farm. sci. e tec. (Pavia) 9, 588 (1951)
- (89) RICE, E.L., Botan. Gaz. 109, 301 (1948)
- (90) ROBERTS, R.H. y STRUCKMEYER, B.E., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44, 417 (1944)
- (91) SELL, H.M., LUECKE, R.W., TAYLOR, B.M., y HAMNER, C.L., Plant Physiol. 24, 295 (1949)

# E. F. N. A.

- (92) SIBBITT, L.D., y HARRIS, R.H. Cereal Chem. 25, 286 (1948)
- (93) SIVORI, E.M., Ciencia e Invest. (B.Aires) 5, 189 (1949)
- (94) SKOOG, F. , Ann. Rev. Biochem. 16, 529 (1947)
- (95) SKVORTSOV, S.S. , Doklady Akad. Nauk. S.S.S.R. 67, 1155 (1949)
- (96) SMITH, G.H., "An Introduction to Industrial Mycology", 2<sup>a</sup> ed., London, E. Arnold (1942)
- (97) SMITCH, N.R., DAWSON, V.T. y WENZEL, M.E., Soil Sci. Soc. Am. Proc., 10, 197 (1945)
- (98) SMITH, M.S. y WAIN, R.L., Proc. Roy. Soc. London (B) 139, 118 (1951)
- (99) SOWA, J.F., U.S. 2.580.474 Jan. 1, 1952
- (100) STAHLER, L.M., Agr. Food Chem. 1, 183 (1953)
- (101) STANDEN, H.H. y BAUMGARTNER, L.L., U.S. 2.568.031, Sept.18,(1951)
- (102) STEVENSON, E.C. y MITCHELL, J.W., Science 101, 642 (1945)
- (103) STEWART, W.S. y CONDIT, I.J., Am. J. Bot. 36, 332 (1949)
- (104) STEWART, W.S., Citrus Leaves 28, N<sup>o</sup> 11, 6,24; Calif. Citrograph 34, 58,80 (1948)
- (105) STEWART, W.S., U. S. 2.535.877, Dec. 26, 1950
- (106) STEWART, W.S. y HIELD, H.Z., Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 58, 53-6 (1951)
- (107) STILES, H.R., PETERSON, W.H. y FRED, E.E., J. Bact., 12, 427 (1926)
- (108) SWANSON, C.P., Botan. Gaz. 107, 522 (1946)
- 109 ) SWARRICK, T., Ann. Rept. Agr. Hort. Research Stat., Long Ashton, Bristol 1943, 31
- (110) SWEET, R.D., RALEIGH, J.G. y KUNKEL, R., Food Packer, 25, N<sup>o</sup> 12, 43 (1944)
- (111) THOM, C. y RAPER, K.B., " A Manual of the Aspergilli ", Williams y Wilkins, 1945
- (112) THOMPSON, H.E., SWANSON, C.P. y NORMAN, A.G., Botan. Gaz., 107, 476 (1946)
- (113) TRIGG, C. y STAHLY, G.L., Ohio J. Sci. 48, 49 (1948)
- (114) TUKEY, H.B., HAMNER, C.L. y IMHOFF, B., Botan. Gaz. 107, 62 (1945)

# REFERENCIAS

- (115) WARREN, J.R., GRAHAM, F. y GALE, G., *Phytopathology*, **41**, 1037 (1951)
- (116) WASICKY, R., y HOEHNE, W., *Anais Faculdade Farm. e Odontol. Univ. Sao Paulo*, **7**, 417 (1949)
- (117) WEAVER, R.J. y ROSE, H.R., *Botan. Gaz.* **107**, 509 (1946)
- (118) WEINTRAUB, R.L., *Agr. Food Chem.*, **1**, 250 (1953)
- (119) WEINTRAUB, R.L., BROWN, J.W., FIELDS, M. y ROHAN, J., *Plant Physiol.* **27**, 292 (1952)
- (120) WENT, F.W., *Arch. Biochem.* **20**, 121 (1949)
- (121) WEST, F.R. y HENDERSON, J.H.M., *Science* **107**, 604 (1948)
- (122) WOLF, D.E., *Agr. Food Chem.* **1**, 181 (1953)
- (123) WORTH, W.A. y Mc CABE, A.M., *Science* **108**, 16 (1948)
- (124) YU-TIEN HSIA y CHRISTENSEN, J.J., *Phytopathology* **41**, 1011 (1951)
- (125) ZIMMERMANN, P.W. y HITCHCOCK, A.E., *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **12**, 321 (1942)
- (126) ZIMMERMANN, P.W. y HITCHCOCK, A. E., *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **45**, 353 (1944)
- (127) ZIMMERMANN, P.W., *Ind. Eng. Chem.* **35**, 596 (1943)
- (128) ZIMMERMANN, P.W. y HITCHCOCK, A.E., *Ann. Rev. Biochem.* **17**, 601 (1948)
- (129) ZOBELL, C.E., *Bacteriological Reviews* **10**, 1 (1946).

-----  
-----  
-----

*Armed*  
