

## Comunicación corta

### Efecto de fertilizantes y herbicidas sobre el crecimiento *in vitro* de *Azospirillum brasilense* C16

Felipe Romero-Perdomo, Paola Jimena Criollo Campos, Andrea Jineth Rodríguez, Mauricio Camelo Rusinque, Ruth Rebeca Bonilla Buitrago\*

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria–Corpoica Tibaitatá. Laboratorio de Microbiología de Suelos. Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

Recibido 5 de junio de 2015; aceptado 9 de octubre de 2015

**Resumen:** El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia de fertilizantes (urea, fosfato diamónico y cloruro de potasio) y herbicidas (glifosato y 2,4-D) sobre la viabilidad de *A. brasilense* C16. Dicha viabilidad fue cuantificada en tres concentraciones de cada agroquímico, en un medio mínimo de sal, a las 0, 12 y 24 horas de crecimiento. Los resultados demostraron que el tipo de agroquímico, su concentración y el tiempo de exposición influyeron sobre C16 ( $p < 0,05$ ). El efecto inhibitorio observado demostró estar directamente relacionado con incrementos en la concentración de los agroquímicos. La cepa C16 mostró mayor sensibilidad a los herbicidas comparado con los fertilizantes. El glifosato, el 2,4-D y el cloruro de potasio disminuyeron 43, 27 y 26% respectivamente la viabilidad de C16 a las 24 horas en su máxima concentración. En cambio, la urea (23%) y el fosfato diamónico (50%) promovieron el crecimiento de *A. brasilense* C16 en 12 y 6%.

**Palabras clave:** *Azospirillum brasilense*, urea, fosfato diamónico, cloruro de potasio, glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

### Effect of fertilizers and herbicides on the *in vitro* growth of *Azospirillum brasilense* C16

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the influence of fertilizers (urea, diammonium phosphate and potassium chloride) and herbicides (glyphosate and 2,4-D) on the viability of *A. brasilense* C16. We measured C16 viability at three different concentrations for each agrochemical in a minimal salt medium at 0, 12 and 24 hours of growth. Results showed that type, concentration and time of exposure for each agrochemical influenced on C16 ( $p < 0.05$ ). We observed that the inhibitory effect was higher with increasing agrochemical concentration. C16 exhibited more susceptibility to herbicides compared to fertilizers. Glyphosate, 2,4-D and potassium chloride decreased C16 viability to 43, 27 and 26% respectively at 24 hours at maximum concentration. Instead, urea (23%) and diammonium phosphate (50%) promoted growth of the strain up to 12 and 6%.

**Keywords:** *Azospirillum brasilense*, urea, diammonium phosphate, potassium chloride, glyphosate, 2,4 – dichlorophenoxyacetic acid.

\* Correspondencia:  
E-mail: rbonilla@corpoica.org.co

#### Introducción

Una de las prácticas de todo sistema agrícola que perjudica la fertilidad del suelo es el uso excesivo de agroquímicos. Su acumulación afecta la biomasa y la actividad de microorganismos relacionados con la disponibilidad y el ciclaje de nutrientes para las plantas [1]. Un ejemplo de esta problemática se refleja en el sector pecuario colombiano. El área de producción de este sector es del 88% a nivel nacional, donde gran parte está dedicada a pastos para ganadería bovina y manejada bajo un sistema

de producción intensiva. En este sector son ampliamente usados fertilizantes como urea (carbamida), fosfato diamónico (DAP), cloruro de potasio (KCl), y herbicidas como glifosato (N-fosfonometilglicina) y 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), para aumentar el rendimiento y para protección contra patógenos [2]. Una alternativa sostenible para sustituir parte de estos agroquímicos es la utilización de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) como biofertilizantes y controladores biológicos [3].

*Azospirillum* es una BPCV de vida libre capaz de

fixar nitrógeno, solubilizar fósforo, producir giberelinas e indoles, y establecer asociaciones con plantas para incrementar la tasa de absorción de agua y minerales sobre cultivos de arroz, maíz y pastos tropicales [4]. Aunque *Azospirillum* ha sido usado como modelo de BPCV para estudiar los mecanismos de interacción con las plantas, el efecto *in vitro* con agroquímicos en cuanto a su viabilidad ha sido poco explorado. El objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia *in vitro* de tres fertilizantes y dos herbicidas aplicados a Pasto Guinea sobre el crecimiento de *A. brasilense* C16.

## Materiales y métodos

Se empleó la cepa C16 identificada molecularmente como *Azospirillum brasilense*. Esta cepa fue provista por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de Corpoica (Mosquera, Colombia). La reactivación de C16 fue realizada en medio batata (en g/L: C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> 2,5; glucosa 2,5; batata 200; CuSO<sub>4</sub> 0,04; ZnSO<sub>4</sub> 1,2; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,4; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,0; MnSO<sub>4</sub> 1,175; pH 7,0) a 30 ± 2 °C durante 48 horas.

Tres fertilizantes y dos herbicidas aplicados en la producción de Pasto Guinea (*Panicum maximum*) fueron utilizados a diferentes concentraciones (% p/v): urea (0, 23, 46 y 69), DAP (0, 50, 100 y 150), KCl (0, 50, 100 y 150), glifosato (0; 0,5; 1 y 1,5) y 2,4-D (0; 0,5; 1 y 1,5). El inóculo de C16 fue estandarizado en medio mínimo de sal (en g/L: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,02; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,01; pH 6,5) empleando el 10% (v/v) de una suspensión bacteriana en NaCl 0,85% con una densidad óptica de 0,2 a 600 nm. La relación del medio con cada agroquímico fue 1:10 (v/v). Como control se usó el medio mínimo de sal inoculado sin adición de agroquímico. La variable de respuesta empleada fue viabilidad celular expresada en [Log<sub>10</sub> UFC·mL<sup>-1</sup>] mediante la técnica de dilución decimal y siembra en placa por microgota. Se realizaron tres muestreos por triplicado a las 0, 12 y 24 horas.

**Análisis estadístico:** Los datos fueron analizados mediante una prueba de varianza ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey. Los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS 17 (Analytical Software, Florida, USA). Todos los análisis se realizaron con un 95% de nivel de confianza.

## Resultados y discusión

Los resultados revelaron que el tipo de agroquímico, su concentración y el tiempo de exposición influyeron significativamente sobre la viabilidad de *A. brasilense* C16 (p<0,05). La adición de 23% de urea y 50% de DAP aumentaron el crecimiento de la cepa en 12 y 6%, respectivamente. La aplicación de 100% de DAP no generó cambios frente al control (Figuras 1a y 1b). En cambio, disminuciones significativas (p<0,05) en la viabilidad de C16 de 16, 27 y 9% fueron evidenciadas en presencia de

46 y 69% de urea y 150% de DAP respectivamente. Estos resultados sugieren que bajas dosis de urea y DAP favorecen el crecimiento de *A. brasilense* C16, pero a medida que aumenta la concentración se genera un efecto inhibitorio. Posiblemente concentraciones mayores a 100% de DAP y 23% de urea generan inhibición por exceso de sustrato en C16. Resultados similares obtuvieron Maheshwari *et al.*, al afirmar que pequeñas concentraciones de urea (0,3 M) y DAP (0,037 M) estimulan el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 y *Sinorhizobium meliloti* RMP1; sin embargo, aumentos en la concentración de estos dos fertilizantes generan disminuciones de la tasa de crecimiento al alterar la permeabilidad de la membrana celular y la síntesis de ADN [5].

El KCl es la fuente de fertilización de potasio más usada en el mundo. Este fertilizante contiene aproximadamente 60% de potasio en forma de óxido de potasio (K<sub>2</sub>O) y 40% de cloro. El KCl fue el único fertilizante que afectó severamente el crecimiento de C16 (Figura 1c). La única concentración que permitió la multiplicación de la cepa fue la de 50% hasta las 12 horas de incubación. En esta hora se cuantificó una concentración de 10,81 [Log<sub>10</sub> UFC·mL<sup>-1</sup>] sin encontrarse diferencias significativas (p>0,05) frente al control. Pocos estudios han demostrado el efecto de este fertilizante sobre el crecimiento bacteriano. Maheshwari encontró menor tolerancia de *P. fluorescens* a KCl (1500 ppm) sin determinar un efecto intracelular [6]. Estos resultados sugieren que en condiciones *in vitro* C16 no es compatible con concentraciones mayores o iguales a 50% de KCl. Se requiere de una amplia investigación para dilucidar si las dosis de KCl aplicadas en campo pueden también inhibir el crecimiento y metabolismo de esta bacteria.

Por otro lado, *A. brasilense* C16 mostró mayor sensibilidad a los herbicidas empleados, como es el caso del glifosato, que generó el mayor efecto tóxico en la cepa. Esto se debe a que el principio activo y funcionalidad que tienen los herbicidas para inhibir el crecimiento de plantas no deseadas afectan más el metabolismo de microorganismos en comparación a un fertilizante que busca ser fuente nutricional para los cultivos. La única concentración de glifosato en que se evidenció la adaptación de la cepa fue en 0,5% durante las primeras 12 horas de contacto, sin diferencias significativas respecto al control (Figura 1d). A las 24 horas se encontraron disminuciones de 24, 32 y 56% a 0,5, 1 y 1,5% de glifosato frente al control, respectivamente. Mayor sensibilidad *in vitro* al glifosato presentaron varias especies de *Bradyrhizobium* sp. de soya respecto a *A. brasilense* C16. Concentraciones superiores a 210,26 μM inhibieron hasta 50% las poblaciones de *B. elkanii* (BR 29, INPA 80A y INPA 553A) y *B. japonicum* (BR 86) a las 120 horas de incubación, como consecuencia del bloqueo de la síntesis de ácidos aromáticos, en particular la ruta del ácido shikímico [7].

Por último, se encontró que el 2,4-D fue el agroquímico que no permitió la adaptación de C16. Disminuciones progresivas de la viabilidad fueron observadas a medida que la concentración aumentaba con diferencias

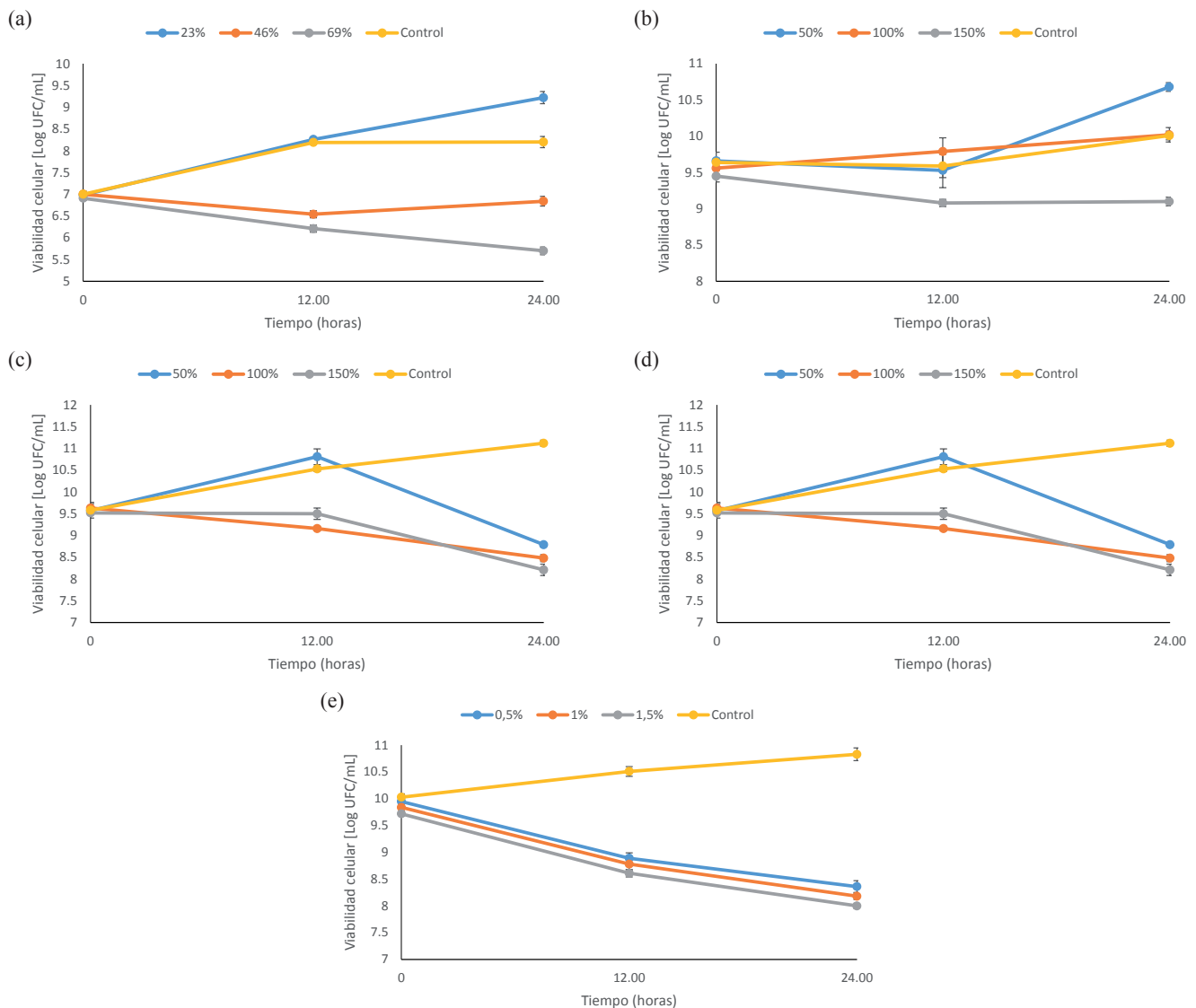


Figura. 1. Crecimiento de *A. brasilense* C16 en presencia de tres fertilizantes y 2 herbicidas: (a) Urea, (b) DAP, (c) Cloruro de potasio, (d) Glifosato y (e) 2,4-D. La barra de errores representa  $\pm$  la desviación estándar. Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas basado en el test Tukey HSD ( $p < 0.05$ ).

significativas en los recuentos desarrollados entre las 12 y 24 horas respecto a la hora de inicio del bioensayo ( $p < 0,05$ ). Concentraciones de 8,36; 8,18 y 8,00 [ $\text{Log}_{10}$  UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$ ], fueron alcanzadas en 0,5; 1 y 1,5% de 2,4-D a las 24 horas respectivamente, aunque el efecto fue menor en comparación a glifosato (Figura 1e). La variación en tolerancia a compuestos xenobióticos se debe a la capacidad bacteriana para poder biodegradarlos o hidrolizarlos enzimáticamente y provocar así una disminución parcial o total de su grado de toxicidad [8]. Bacterias gramnegativas como *P. diminuta* MG o *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 no son afectadas por compuestos organofosforados, por poseer la enzima organofósforo hidrolasa [9]. Por el contrario, *A. brasilense* no presenta la capacidad metabólica para disminuir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas a nivel ribosomal, generados por compuestos de la familia de ácidos fenoxi-carboxílico, como el 2,4-D, que corrobora el comportamiento de C16 [10].

## Conclusión

La influencia de los fertilizantes y herbicidas en el crecimiento de *A. brasilense* C16 depende del principio activo y concentración empleada. Concentraciones bajas de urea y fosfato diamónico estimulan la producción de C16. Por el contrario, efectos tóxicos son generados a partir de cloruro de potasio, glifosato y 2,4-D. Este estudio demostró que los agroquímicos deben ser evaluados *in vitro* por posibles efectos negativos en el metabolismo de microorganismos benéficos del suelo antes de su aplicación en cultivos para la mejora de prácticas agrícolas.

## Referencias

1. Lin Q, Zhao HM, Chen YX. Effects of 2, 4-dichlorophenol, pentachlorophenol and vegetation on microbial characteristics in a heavy metal polluted

- soil. J Environ Sci Health B. 2007; 42:551-7.
2. Mahecha L, Gallego L, Pelaez F. Situación actual de la ganadería de carne en Colombia y alternativas para impulsar su competitividad y sostenibilidad. Rev Col Cienc Pec. 2002; 15:213-25.
  3. Bashan Y, de-Bashan LE. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. Adv Agron. 2010; 108:77-136.
  4. Cárdenas DM, Garrido MF, Roncallo B, Bonilla R. Inoculación con *Azospirillum* spp. y *Enterobacter agglomerans* en Pasto Guinea (*Panicum maximum* Jacq.) en el Departamento de Cesar (Colombia). Rev Fac Nal Agr. 2014; 67:7271-80.
  5. Maheshwari DK, Sandeep Kumar S, Kumar B, Pandey P. Co-inoculation of urea and DAP tolerant *Sinorhizobium meliloti* and *Pseudomonas aeruginosa* as integrated approach for growth enhancement of *Brassica juncea*. Indian J Microbiol. 2010; 50:425-31.
  6. Maheshwari MN. Study of the compatibility of various fluorescent *Pseudomonas* isolates against different chemical fertilizers. Ind J Sci Res Tech. 2013; 1:8-11.
  7. Maly JDS, Siqueira JO, De Souza FM. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. Pesq Agropec Bras. 2006; 41:285-91.
  8. Yang C, Lee C. Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20. Biodegradation. 2008; 19:329-36.
  9. Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR, Raushel FM. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. J Biol Chem. 1989; 261:19659-65.
  10. Aguirre-Cadena JF, Téllez SR, Cuautle M, Aguirre-Medina JF. Sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* después de aplicar herbicidas en *Triticum aestivum* L. Var. Altiplano. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2007; 5: 1549-55.