

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

fijar 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: $C_4H_6O_5$ 2,5; glucosa 2,5; batata 200; $CuSO_4$ 0,04; $ZnSO_4$ 1,2; H_3BO_3 1,4; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 1,0; $MnSO_4$ 1,175; pH 7,0) a $30 \pm 2^\circ C$ 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_2PO_4 1; K_2HPO_4 1; NH_4NO_3 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,02; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 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 $[Log_{10} UFC \cdot mL^{-1}]$ 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_2O) 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 $[Log_{10} UFC \cdot mL^{-1}]$ 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

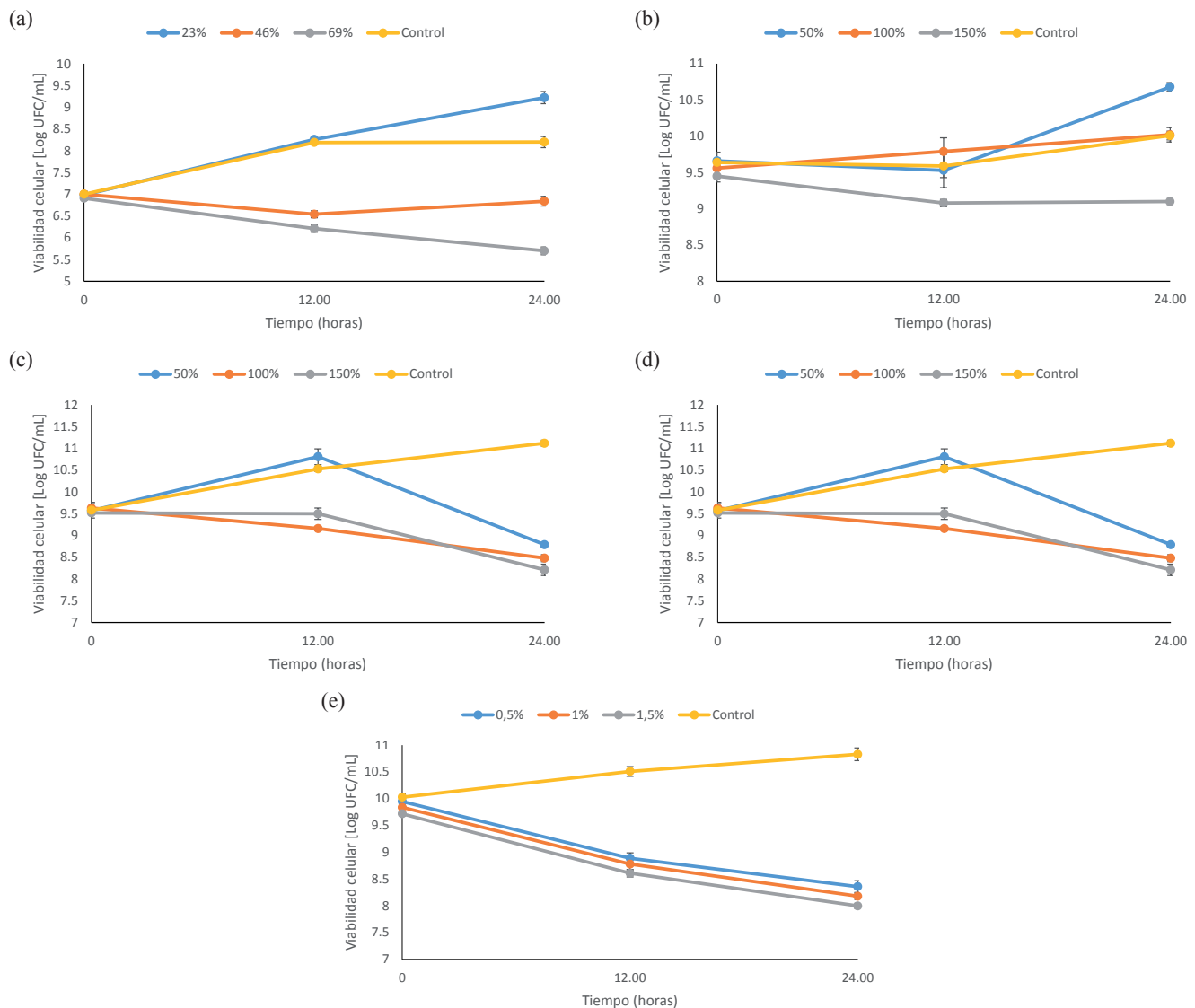


Figura. 1. Crecimiento de *A. brasilense* C16 en presencia de tres fertilizantes y 2 herbicidas: (a) Urea, (b) DAP, (c) Cloruro de potasio, (d) Glifosato y (e) 2,4-D. La barra de errores representa $\pm$ la desviación estándar. Las diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas 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 [$\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$], 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.