

## Comunicación breve

**Efecto de la carragenina sobre *Azotobacter chroococcum* en semillas de algodón peletizadas con un fungicida****Carrageenan effect on *Azotobacter chroococcum* in seeds of cotton pelleted with a fungicide**

F.A. Romero-Perdomo; A. Moreno-Galván; M. Camelo-Rusinque; R. Bonilla\*

Laboratorio de Microbiología de Suelos. Centro de Investigación Tibaitatá.  
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica.  
Tibaitatá Km 14 Via Mosquera - Cundinamarca. Mosquera, Colombia

\*Autor de correspondencia: rbonilla@corpoica.org.co

**Resumen**

*Azotobacter chroococcum* es una de los microorganismos que mayor promoción de crecimiento vegetal genera a cultivos de algodón. Sin embargo la influencia de polímeros sobre su viabilidad en presencia de fungicidas es desconocida. En el presente estudio, se evaluó el efecto del polímero carragenina sobre la compatibilidad de un inoculante a base de *A. chroococcum* con el fungicida Vitavax® peletizado en semillas de algodón. El experimento consistió de seis tratamientos completamente al azar con tres repeticiones por triplicado. Se varió la adición de fungicida y polímero. La estimación de viabilidad celular, como variable de respuesta, fue realizado a tres tiempos de secado: 0, 24 y 48 horas. Los datos fueron expresados como log UFC mL<sup>-1</sup>. A pesar de la naturaleza del Vitavax®, se evidenció que éste afecta la viabilidad de *A. chroococcum* en ausencia de polímero. Por otro lado, se observó un efecto significativo de la carragenina sobre la biomasa celular en presencia de Vitavax® hasta las 24 horas de secado (p<0.05). Este polímero demostró ser capaz de ejercer un efecto adherente y protector de las bacterias mitigando la acción perjudicial del fungicida. Estos resultados indican que el uso de polímeros como la carragenina representa una alternativa promisoría para reducir los efectos perjudiciales de fungicidas como Vitavax® sobre la microflora de los suelos.

**Palabras clave:** bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), biopolímeros, carboxín, captan.

**Abstract**

*Azotobacter chroococcum* is one of the microorganism with greater plant growth development in cotton crops. Nevertheless, the influence of polymers on its viability in presence of fungicides is unknown. In the present study, the effect of carrageenan polymer on the compatibility of an *A. chroococcum* based inoculant with Vitavax® pelleted fungicides in cotton seeds was evaluated. The experiment consisted of six treatments completely randomized with three replications in triplicate. The addition of fungicide and polymer were varied. Estimation of cell viability, response variable, was performed at three times of drying: 0, 24 and 48 hours. Data were expressed as log CFU mL<sup>-1</sup>. Results evidenced that despite of nature of Vitavax®, this affect viability of *A. chroococcum* in absence of polymer. Moreover, it was observed a significant effect of carrageenan on cell biomass in presence of Vitavax® up to 24 hours of drying (p <0.05). This polymer proved to be able to exert an adherent and protective effect on bacteria by mitigating the harmful action of fungicide. These results indicate that the use of polymers as carrageenan represents a promising alternative to reduce the harmful effects of fungicides as Vitavax® on soil microflora.

**Keywords:** plant growth-promoting bacteria, biopolymers, carboxin, captan.

En la actualidad, el sector agroindustrial tiene dependencia a una amplia variedad de productos químicos como insecticidas, fungicidas, herbicidas entre otros (Cycon *et al.*, 2013). Dentro del sistema algodonero a nivel mundial, el Vitavax® es el fungicida comúnmente usado para el control

y la prevención de enfermedades causadas por *Botrytis* sp, *Fusarium* sp y *Pythium* sp que atacan a semillas y plántulas (Roger *et al.*, 2013). Sus principios activos son el carboxín (5,6-dihidro-2-metil-N-fenil-1,4-oxatiin-3-carboximida) y el captan (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-di-

carboximida) (Solano-Bonilla y Brenes-Chacón, 2012). Aunque a veces el Vitavax® no se aplique directamente al suelo, sino que es peletizado en la semilla, la posibilidad de que tengan un efecto adverso sobre la microflora del suelo que llevan a cabo procesos de promoción de crecimiento vegetal podría ser de gran importancia (Miñambres *et al.*, 2010).

Dentro de los procesos microbianos que promueven el crecimiento y la nutrición vegetal se encuentra la fijación de nitrógeno ( $N_2$ ). *Azotobacter* sp, es una bacteria fijadora de  $N_2$  de vida libre que ha demostrado tener efectos beneficiosos en el rendimiento de diversos cultivos (Guzmán *et al.*, 2012). Se ha demostrado que la inoculación con *A. chroococcum* RK49 en trigo da lugar a una mejora en el rendimiento del grano comparado con el control (Kizilkaya, 2008). Del mismo modo, Rojas-Tapias *et al.* (2012) demostró el papel de *A. chroococcum* C5 y C9 para mitigar el estrés salino en plantas de maíz.

Aunque *A. chroococcum* ha demostrado ser capaz de promover el crecimiento en cultivos de interés agroindustrial, existe muy poca información del impacto de agroquímicos sobre su viabilidad celular (Martin *et al.*, 2011). Asimismo, no hay claridad del rol que ejercería la utilización de polímeros sobre la relación agroquímico-microorganismo. Por ende, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la carragenina sobre la compatibilidad de un inoculante basado en *A. chroococcum* con el fungicida Vitavax® peletizado en semillas de algodón a diferentes tiempos de secado.

Para ello, se emplearon las cepas AC1 y AC10 identificadas molecularmente por sus genes *nifH* como *Azotobacter chroococcum*. Éstas fueron seleccionadas por su potencial como biofertilizantes (datos no mostrados) sobre el cultivo del algodón (*Gossypium sp*), y fueron provistas por el Laboratorio de Microbiología de Suelos de Corpoica, Colombia. Las cepas fueron aisladas a partir de suelos destinados al cultivo del algodón en el departamento del Cesar, Colombia (Bonilla y Morales, 2005). Las cepas fueron reactivadas en medio Ashby (g/L: manitol 10,  $K_2HPO_4$  0.2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2, NaCl 0.2,  $CaSO_4$  0.1,  $CaCO_3$  10.0, agar 15.0, pH 7.5). Posteriormente, se realizó un preinóculo en medio MBR (Moreno-Gálvan *et al.*, 2011) como cultivo *overnight* a condiciones estándar:  $30 \pm 2$  °C y 150 rpm.

La estandarización del inóculo de cada cepa se realizó en medio MBR líquido empleando 1% (v/v) de preinóculo. Las condiciones de incuba-

ción estándar fueron:  $28 \pm 2$  °C, 24h y 150 rpm. Cada inóculo fue ajustado a  $DO_{600}=0,5$  (Genezy UV 10, Thermo Corporation). Por último se mezclaron los inóculos a una relación 1:1.

El efecto de la carragenina sobre la interacción Vitavax®- *A. chroococcum* se evaluó mediante un diseño completamente al azar compuesto por seis tratamientos con tres repeticiones por triplicado de cada uno (Tabla 1). La variable de respuesta empleada fue viabilidad celular empleando la técnica de microgota y diluciones seriadas (Doyle *et al.*, 2001). Los datos fueron expresados en Log (UFC  $ml^{-1}$ ) a las 0, 24 y 48 horas de secado a  $30 \pm 2$  °C.

**Tabla 1.** Tratamientos para evaluar el efecto de la carragenina sobre *A. chroococcum*-Vitavax®.

Tratamientos	Identificación
Testigo absoluto*	T1
Testigo químico**	T2
Semilla sin fungicida + <i>A. chroococcum</i> sin polímero	T3
Semilla sin fungicida + <i>A. chroococcum</i> con polímero	T4
Semilla con fungicida + <i>A. chroococcum</i> sin polímero	T5
Semilla con fungicida + <i>A. chroococcum</i> con polímero	T6

\*Semilla sin fungicida, sin inoculación y sin polímero.

\*\*Semilla con fungicida, sin inoculación y sin polímero

La concentración empleada para hidratar el polímero carragenina fue de 1,5% (m/v) (Biopolímeros del FMC- Ewing, EE.UU.) y la relación usada para su mezcla con el inóculo fue 1:10, respectivamente.

El proceso de peletización inició con la desinfección de las semillas de algodón sumergiéndolas en peróxido de hidrógeno 30% (v/v) y etanol 70% (v/v) por 10 min cada uno, seguido por enjuagues consecutivos con agua destilada estéril (Sánchez *et al.*, 2014). Posteriormente, se mezclaron las semillas con el Vitavax® a una dosis de 200 g de Vitavax® /100 kg semilla/l agua. Después se realizó el proceso de secado a temperatura ambiente. Por último, se procedió a la adhesión *in vitro* del inóculo a las semillas con o sin carragenina, dependiendo de los tratamientos, mediante la siguiente dosis: 15 kg de semilla algodón/l inóculo final.

Como análisis estadísticos, se aplicaron un ANOVA univariante y un test HSD-Tukey para pruebas post hoc. Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico SPSS 17. Todos los experimentos se realizaron con un 95% de nivel de

confianza.

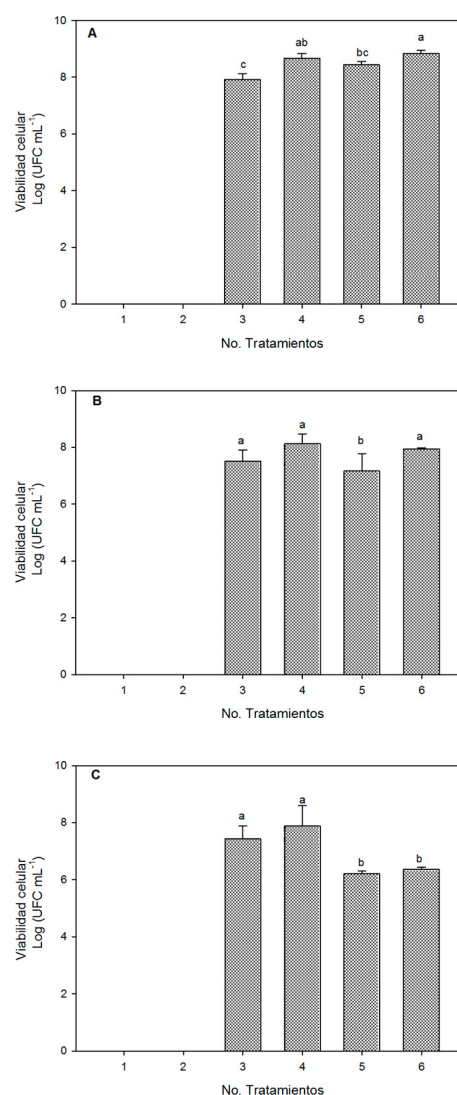
Los resultados mostraron que el Vitavax® redujo drásticamente la viabilidad celular de *A. chroococcum*. En el T3, conformado por las semillas de algodón sin Vitavax® más *A. chroococcum* sin carragenina, se evidenció que la población bacteriana se mantuvo constante a través del tiempo (Figura 1A). Por el contrario, una disminución de la viabilidad celular en cada hora de muestreo se observó en el T5, el cual sí presentaba Vitavax® con *A. chroococcum* sin carragenina. Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) existieron en cada hora de secado del T5 y de este tratamiento hacia el T3. A las 48 horas de secado se cuantificó un porcentaje de recuperación del 92,88% y 73,33% para T3 y T5, respectivamente. Con lo anterior se dedujo que la naturaleza ftáldimica y oxatina del Vitavax® no sólo inhibe flora fúngica de géneros específicos, sino también puede disminuir la viabilidad celular de bacterias pertenecientes a *A. chroococcum* (Avenot y Michilides, 2010). Estudios similares afirman que el efecto sobre *Azotobacter sp* depende del principio activo del agroquímico. Por ejemplo, Vig *et al.*, (2008) demostraron que la cipermetrina no es compatible con poblaciones de *Azotobacter sp*. En contraste, Rivera *et al.*, (2010) afirmaron la existencia de un efecto benéfico generado por el fungicida Thiram y el insecticida Benzidina en el crecimiento de éste género.

Por otro lado, la adición de la carragenina generó respuestas diferentes frente a la interacción semilla-microorganismo-Vitavax®. Se comprobó que el polímero es capaz de favorecer la adherencia entre el material celular y la superficie de la semilla. Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) fueron encontradas a la hora 0 de secado entre T3 y T4 (Figura 1A) con cuantificaciones de  $8.87E+7$  UFC  $ml^{-1}$  y  $4,89E+8$  UFC  $ml^{-1}$ , respectivamente. Las  $4.0E+7$  UFC  $ml^{-1}$  de más cuantificadas en T4 están atribuidas a la alta viscosidad que posee la carragenina para generar un efecto adherente a las células sobre las semillas de algodón (Campo *et al.*, 2009).

Otra respuesta observada, cuando se agregó la carragenina, fue entre los tratamientos 3 y 4, y 5 y 6. A las 24 horas de secado, este polímero ejerció un efecto significativo sobre la viabilidad celular de las cepas ( $p < 0,05$ ). Siempre que el polímero se encontraba presente, se obtenía mayor recuperación de UFC  $ml^{-1}$  (Figura 1B). Específicamente se obtuvieron porcentajes de 93,73% y 89,98% para T4 y T6. Lo anterior reflejó la capacidad protectora de la carragenina sobre *A. chroococcum*. Entre T3 y T4 se observó un efecto protector que

contrarresta la ausencia de fuentes nutricionales y entre T5 y T6 hacia la presencia de Vitavax®. Estos resultados demuestran que la carragenina no sólo actúa como un agente adherente sino también protector.

Por último, a las 48 horas se cuantificaron pérdidas de viabilidad celular mayores a  $1E+8$  UFC  $ml^{-1}$  en los tratamientos con presencia de Vitavax® aún con polímero (Figura 1C), lo que sugiere que el efecto benéfico de la carragenina influyó sobre *A. chroococcum* al punto de mitigar casi por completo la acción inhibitoria del Vitavax® hasta las 24 horas de secado.



**Figura 1.** Efecto del polímero sobre la interacción fungicida- *A. chroococcum*. Este gráfico muestra las células viables de *A. chroococcum* AC1 y AC10 recuperadas a través del tiempo de secado. 1A: hora 0. 1B: hora 24. 1C: hora 48. Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar. Letras iguales indican grupos homogéneos obtenidos usando el test HSD-Tukey.

Por lo tanto, se concluye que la presencia de Vitavax® afecta la viabilidad celular del inoculante a base de *A. chroococcum* en ausencia de un adyuvante.

vante como la carragenina. Además, se demostró tanto el efecto adherente como protector de la carragenina sobre las cepas evaluadas en presencia del fungicida, y que este efecto se mantiene únicamente hasta las 24 horas de secado.

### Agradecimiento

El presente estudio fue financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y hace parte de la red de Transitorios y cultivos agroindustriales de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria.

### Referencias bibliográficas

- Avenot F., Michilides T. (2010). Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29(7): 643-651.
- Bonilla R., Morales J. (2005). Monibac biofertilizante con base en cepas nativas de *Azobacter* sp. para incrementar la productividad y sostenibilidad del algodón. *Innovación y cambio tecnológico*. Corpoica 4: 30-34.
- Campo V., Kawano D., Da Silva J.R., Carvalho I. (2009). Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis. *Carbohydrate Polymers* 77(2): 167-180.
- Cycon M., Markowicz A., Piotrowska-Seget Z. (2013). Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches. *Applied Soil Ecology* 72: 242-250.
- Doyle M., Beuchat L., Montville T. (2001). *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. 1 ed. España: Acribia, Zaragoza, p. 816.
- Guzmán A., Obando D., Rivera D. (2012). Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). *Revista Colombiana de Biotecnología* 14(1): 182 – 190.
- Kizilkaya R. (2008). Yield response and nitrogen concentrations of spring wheat (*Triticum aestivum*) inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. *Ecological Engineering* 33(2): 150-156.
- Martin X.M., Sumathi C.S., Kannan V.R. (2011). Influence of agrochemicals and *Azotobacter* sp. application on soil fertility in relation to maize growth under nursery conditions. *Eurasia Journal of Bioscience* 5: 19-28.
- Miñambres G.G., Conles M.Y., Lucini E.I., Verdenelli R.A., Meriles J.M., Zygadlo J.A. (2010). Application of thymol and iprodione to control garlic white rot (*Sclerotium cepivorum*) and its effect on soil microbial communities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(1): 161-170.
- Moreno-Gálvan A., Rojas-Tapias D., Bonilla R. (2011). Sequential statistical design application in identification of *Azotobacter chroococcum* AC1 nutritional sources. *Corpoica* 11(2): 151-158.
- Rivera D., Estrada G., Obando M., Camelo M., Bonilla R. (2010). Efecto de diferentes plaguicidas sobre el crecimiento de *Azotobacter chroococcum*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12 (1): 94-102.
- Rojas-Tapias D., Moreno-Gálvan A., Pardo-Díaz S., Obando M., Rivera D., Bonilla R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* 61: 264-272.
- Roger P., Cardoso E., Martines A., Sousa J., Pasini A. (2013). Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. *Chemosphere* 90 (11): 2674-2682.
- Sánchez D., Romero-Perdomo F.A., Bonilla R. (2014). Respuesta de *Physalis peruviana* L. A la inoculación con bacterias solubilizadoras de fosfato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(5): 901-906.
- Solano-Bonilla M., Brenes-Chacón D. (2012). Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal de talluelo. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú* 9(22): 63-65.
- Vig K., Singh D.K., Agarwal H.C., Dhawan A.K., Dureja P. (2008). Soil microorganisms in cotton fields sequentially treated with insecticides. *Ecotoxicology and environmental safety* 69: 263-276.