

## Sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* después de aplicar herbicidas en *Triticum aestivum* L. Var. Altiplano\*

## Survival of *Azospirillum brasilense* after applying herbicides on *Triticum aestivum* L. Var. Altiplano

Juan Francisco Aguirre-Cadena<sup>1</sup>, Silvia Reyna Téllez<sup>2</sup>, Mariana Cuautle<sup>2</sup> y Juan Francisco Aguirre-Medina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados. Campus Puebla, Carretera Federal México-Puebla km. 125.5, Santiago Momoxpan, San Pedro Cholula, Puebla. C. P. 72760, México. (juaguirre86@hotmail.com). <sup>2</sup>Universidad de las Américas Puebla Sta. Catarina Mártir. Cholula, Puebla. C. P. 72810. +52 (222) 229 20 00. (silvia.reyna@udlap.mx; mcuautle2004@hotmail.com). <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Entronque carretera costera y Estación Huehuetán. C. P. 30660. (964) 6270439. Huehuetan, Chiapas, México. (juanf56@prodigy.net.mx). <sup>4</sup>Autor para correspondencia: juanf56@prodigy.net.mx.

### Resumen

Los herbicidas son ampliamente utilizados en la agricultura y se aplican en diversas cantidades que pueden influir directa o indirectamente en los microorganismos del suelo y sus procesos. Con el objetivo de evaluar la sobrevivencia de *Azospirillum brasilense* inoculado en la variedad altiplano de trigo a la aplicación de dos tipos de herbicidas comerciales, un organoclorado y otro organofosforado, se estableció el presente experimento en la Ecozona de la Universidad de las Américas-Puebla, México, en condiciones de invernadero en 2009. Las semillas se inocularon antes de la siembra con *Azospirillum brasilense* y los herbicidas se aplicaron 40 días después. Se establecieron los tratamientos: 1) plantas sin inocular (testigo absoluto); 2) inoculación con *Azospirillum* (testigo inoculado); 3) inoculación con *Azospirillum* más aplicación de herbicida 2, 4, D, (organoclorado); 4) inoculación con *Azospirillum* más aplicación de herbicida glifosato (organofosforado); 5) sin inoculación y aplicación de herbicida 2, 4, D; y 6) sin inoculación y aplicación de glifosato, en un diseño completamente al azar con diez repeticiones. Se registró la sobrevivencia de la bacteria en el sistema radical mediante la técnica número más probable y en la planta se registró su altura y peso. Los resultados indican que los dos herbicidas (2, 4, D y glifosato), no afectaron de

### Abstract

Herbicides are widely used in agriculture and are applied in various amounts that may directly or indirectly influence on soil microorganisms and their processes. In order to evaluate the survival of inoculated *Azospirillum brasilense* in the Altiplano variety of wheat to the application of two types of commercial herbicides, an organochlorine and, the other organophosphorus, the present experiment was established in the Ecozone, of the University of the Americas-Puebla, Mexico, under greenhouse conditions in 2009. The seeds were inoculated before planting with *Azospirillum brasilense* and, the herbicides were applied 40 days after. The treatments were applied: 1) uninoculated plants (absolute control); 2) inoculation with *Azospirillum* (inoculated control); 3) inoculated with *Azospirillum* plus herbicide application 2, 4, D, (organochlorine); 4) inoculated with *Azospirillum* plus glyphosate herbicide application (organophosphate); 5) without inoculation and applying herbicide 2, 4, D; and 6) without inoculation and application of glyphosate, in a completely randomized design with ten replicates. The survival of the bacteria in the root system was recorded through the use of the most probable number technique, recording the plant height and weight. The results indicated that, the two herbicides (2, 4, D and glyphosate),

\* Recibido: mayo de 2014  
Aceptado: septiembre de 2014

manera significativa la población de *Azospirillum* presente en la raíz. Las plantas inoculadas con la bacteria, con o sin tratamiento de herbicida registraron mayor biomasa en comparación con las plantas sin inocular. La biomasa se incrementó con la aplicación 2, 4, D.

**Palabras clave:** *Azospirillum*, *Triticum*, herbicidas, sobrevivencia.

Numerosos estudios destacan la capacidad de la bacteria *Azospirillum* para estimular el crecimiento vegetal, el rendimiento, el contenido de nitrógeno en las plantas (Díaz-Zorita y Fernández-Canigia, 2009), la fijación de nitrógeno, la proliferación radical y el desarrollo de actividades hormonales (Bashan y de-Bashan, 2010). La utilización de *Azospirillum* por los productores ha estado acompañada con aplicaciones de agroquímicos, y los más comunes, son los herbicidas. Al respecto, no se han evaluado las cepas contenidas en los biofertilizantes más utilizados por los productores en interacción con los herbicidas y otros agroquímicos. El efecto de algunos herbicidas, como el glifosato (Wardle y Parkinson, 1990; Haney *et al.*, 2002) y 2, 4, D (Wardle y Parkinson, 1990) demuestran cambios temporales en la actividad microbiana.

Chakravarty y Chatarpaul (1990) señalan que el glifosato reduce inicialmente las poblaciones de bacterias y hongos seguido de un estímulo notable. Si la aplicación de un tratamiento de herbicida ejerce un efecto inhibitorio significativo sobre la colonización de raíz por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, podría haber un efecto perjudicial sobre la productividad de los cultivos, reduciendo así, las ventajas derivadas de control de las plantas no deseables asociadas a los cultivos. En este trabajo se planteó determinar la sobrevivencia de *Azospirillum* aplicado a plantas de trigo tratadas con dos herbicidas, uno de ellos sin afectar la planta huésped y el otro induciendo el deterioro o muerte de la misma. Con estas acciones, se espera comparar si la sobrevivencia de la bacteria se incrementa o disminuye cuando se afecta o no, el desarrollo vegetal de la planta huésped.

La presente investigación se desarrolló en el invernadero de la Ecozona en la Universidad de las Américas, Cholula Puebla. Se localiza geográficamente en el paralelo 19° 03' 12" de latitud norte y en el meridiano 98° 17' 00" longitud oeste de Greenwich a 2 300 msnm. El sustrato fue una mezcla de suelo más residuos orgánicos sin esterilizar con textura Franco-arenosa (Bouyoucos), pH de 7.5 (proporción 2:1 potenciómetro), nitrógeno total, 0.13 ppm (Kjeldhal),

did not significantly affected the population of *Azospirillum* in the root. Plants inoculated with the bacteria, with or without herbicide treatment showed increased in biomass compared to the non-inoculated plants. Biomass increased with application 2, 4, D.

**Keywords:** *Azospirillum*, *Triticum*, herbicides, survival.

Several studies highlight the ability of *Azospirillum* bacteria to stimulate plant growth, yield, nitrogen content in plants (Díaz-Zorita and Fernández-Canigia, 2009), nitrogen fixation, radical proliferation and hormone development activities (Bashan and de-Bashan, 2010). The use of *Azospirillum* by the producers has been accompanied with the application of agrochemicals, and the most common, herbicides. In this regard, the strains contained in the commonly used bio-fertilizers by the producers in interaction with herbicides and other agrochemicals have not been evaluated. The effect of some herbicides, such as glyphosate (Wardle and Parkinson 1990; Haney *et al.*, 2002) and 2, 4, D (Wardle and Parkinson, 1990) show temporal changes in microbial activity.

Chakravarty and Chatarpaul (1990) indicated that, the glyphosate reduces populations initially bacteria and fungi followed by remarkable stimulus. If the application of a treatment herbicide exercises one significant inhibitory effect on colonization root by plant growth promoting bacteria, there could be an effect detrimental to the crop productivity, thereby reducing the benefits of controlling undesirable plants associated with the crop. In this work, we set out to determine the survival of *Azospirillum* applied to wheat plants treated with both herbicides, one of them without affecting the host plant and the other inducing the deterioration and death of it. These actions are expected to compare if the survival of the bacteria increases or decreases when it is affected or not, the plant development of the host plant.

This research was conducted in the greenhouse of the Ecozone in the University of the Americas-Puebla, Cholula. It is geographically located at latitude 19° 03' 12" north latitude and at 98° 17' 00" west longitude, at 2 300 meters of elevation. The substrate was a mixture of organic soil waste plus unsterilized sandy-textured (Bouyoucos), pH 7.5 (2:1 potentiometer), total nitrogen, 0.13 ppm (Kjeldahl), total phosphorus 7.5 mg kg<sup>-1</sup> (olsen/spectrophotometer) and, filling 1 kg pots, perforated in the base to promote drainage. The trial was established on August 13, 2009 at

fósforo total  $7.5 \text{ mg kg}^{-1}$  (olsen/Espectrofotómetro) y con el mismo se llenaron macetas de 1 kg perforadas en la base para favorecer el drenaje. La siembra se realizó el 13 de agosto de 2009 a una profundidad de 4 a 5 cm. *Azospirillum brasilense* fue adquirido en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (laboratorio de microbiología) con un contenido de bacterias de  $5 \times 10^8$  por gramo de turba. Se utilizaron plantas de trigo de la variedad altiplano, proporcionada por la red de investigación en trigo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) con 95% de germinación.

El glifosato se utilizó en la dosis recomendada para el uso en campo de ( $0.54 \text{ kg i.a. ha}^{-1}$ ) y el 2, 4, D a razón de  $250 \text{ g ha}^{-1}$  (de  $0.5$  a  $1 \text{ L ha}^{-1}$ ). Las soluciones se aplicaron a la base de las plantas. Las semillas se impregnaron con carboximetil celulosa al 70% y sobre éste, fue adherido el *Azospirillum* a una dosis de 4% del peso de la semilla. En total se tuvieron seis tratamientos; 1) testigo sin inocular y sin aplicación de herbicidas; 2) inoculación con *Azospirillum*; 3) inoculación con *Azospirillum* más aplicación de 2, 4, D, amina; 4) inoculación con *Azospirillum* más aplicación de glifosato; 5) sin inocular y con aplicación de 2, 4, D, amina; y 6) sin inocular y con aplicación de glifosato. Cada tratamiento se repitió 10 veces. Los herbicidas se aplicaron 40 días después de la siembra y cinco días después se realizó el conteo de bacteria presente en el suelo. Las macetas se regaron con agua destilada cada tercer día y fueron distribuidas en un diseño completamente al azar.

Los resultados se analizaron estadísticamente por el mismo método y las comparaciones entre tratamientos mediante Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Para tal fin se utilizó el paquete SAS ver 8.0 para Windows y el graficador Sigma Plot (Jandel Scientific, ver 7.0) para Windows. En todos los casos se verificó que se cumpliera con el supuesto de normalidad y homocedasticidad; en los casos que no se cumplían se realizó una transformación Box Cox, para normalizar los datos, como en el caso del peso seco. Se utilizó la transformación de rangos para cubrir los supuestos de normalidad. En este caso los valores de las alturas son reemplazados por sus rangos. Este tipo de transformación permite realizar una prueba paramétrica en lugar de una no paramétrica, en este caso un Anova de dos vías y genera información acerca de la significancia de la interacción entre factores.

El análisis de la rizósfera, a las dos, tres y cuatro semanas de la aplicación en las plantas no inoculadas con *Azospirillum* presentó pequeña población de *Azospirillum* en el sustrato,

a depth of 4-5 cm. *Azospirillum brasilense* was acquired in the Autonomous University of Puebla (microbiology laboratory) containing bacteria of  $5 \times 10^8$  per gram of peat. We used wheat plants Var. Altiplano provided by the wheat research program of the National Research Institute for Forestry, Agriculture and Livestock (INIFAP) with 95% germination.

Glyphosate was used at the recommended dose used in field ( $0.54 \text{ kg i.a ha}^{-1}$ ) and the 2, 4, D at  $250 \text{ g ha}^{-1}$  ( $0.5$  to  $1 \text{ L ha}^{-1}$ ). The solutions were applied to the base of the plants. The seeds were soaked in 70% carboxymethyl cellulose and it was attached to the *Azospirillum* rate of 4% by weight of the seed. In total, six treatments were taken; 1) uninoculated control without herbicide application; 2) inoculation with *Azospirillum*; 3) inoculated with *Azospirillum* plus application 2, 4, D, amine; 4) inoculation with *Azospirillum* plus glyphosate application; 5) without inoculation and application of 2, 4, D, amine; and 6) and uninoculated glyphosate application. Each treatment was repeated 10 times. The herbicides were applied 40 days after sowing and, five days after, we started counting bacteria present in the soil. The pots were watered with distilled water every other day and were distributed in a completely randomized design.

The results were statistically analysed by the same method and comparisons between treatments by Tukey ( $p \leq 0.05$ ). For this purpose, the package SAS 8.0 for Windows and see the plotter Sigma Plot (Jandel Scientific, see 7.0) for Windows was used. In all cases, we verified to comply with the assumption of normality and homoscedasticity; in cases which were not met, we used a Box Cox transformation to normalize the data, as in the case of dry weight. We used a rank transformation to meet the assumptions of normality. In this case, the values of the heights are replaced with their ranges. Such processing allows a parametric test instead of a non-parametric, in this case a two-way ANOVA and generates information about the significance of the interaction between factors.

The analysis of the rhizosphere, at two, three and four weeks of the application in plants inoculated with *Azospirillum* presented a small population of *Azospirillum* in the substrate, with average values of  $1.5 \times 10^2 \text{ UFC g}^{-1}$ . This uninoculated population of *Azospirillum* indicates its possible adaptation in the soils of the highland. In other environments, their presence has been recorded in natural conditions in the rhizosphere of various grasses and cereals (Cárdenas *et al.*, 2010). Inoculating *Azospirillum* without applying

con valores promedio de  $1.5 * 10^2$  UFC  $g^{-1}$ . Esta población no inoculada de *Azospirillum* indica la posible adaptación de la misma en estos suelos del Altiplano. En otros ambientes, se ha consignado su presencia en condiciones naturales en la rizosfera de diversos pastos y cereales (Cárdenas *et al.*, 2010). Al inocular *Azospirillum* sin aplicar herbicidas la población encontrada fue alta, de  $1 * 10^{12}$  (Cuadro 1). Este mismo hecho se presentó con el tratamiento inoculado más la aplicación de 2-4-D amina y la población de *Azospirillum* no se modificó a través del tiempo. Los cambios se presentaron con la aplicación del glifosato; se incrementó la población de *Azospirillum* desde el primer muestreo. A los 7 días después de la aplicación, *Azospirillum* aumentó en  $0.5 * 10^{12}$  UFC  $g^{-1}$ . Posteriormente, a los 14 días, la población de la bacteria fue inferior a la inicial, y en los muestreos siguientes, se incrementó nuevamente a los 21 y 28 dds (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Supervivencia de *Azospirillum* sp. en la rizósfera de plantas de trigo tratadas con dos herbicidas en comparación con el testigo sin inocular en Puebla, México.**

**Table 1. Survival of *Azospirillum* sp. in the rhizosphere of wheat plants treated with both herbicides compared to uninoculated control in Puebla, Mexico.**

Tratamientos	Tiempo (días)			
	7*	14	21	28
Testigo sin inocular y sin herbicidas	$1.5 * 10^{2**}$	$1.5 * 10^2$	$1.5 * 10^2$	$1.5 * 10^2$
Inoculado con <i>Azospirillum</i>	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$
Inoculado con <i>Azospirillum</i> más aplicación de 2, 4, D amina	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$	$1 * 10^{12}$
Inoculado con <i>Azospirillum</i> más aplicación de glifosato	$1.5 * 10^{12}$	$4.6 * 10^9$	$2.4 * 10^{12}$	$2 * 10^{12}$
Sin inocular y con aplicación de 2, 4, D amina	$2 * 10^2$	$2 * 10^2$	$2 * 10^2$	$2 * 10^2$
Sin inocular y con aplicación de glifosato	$7 * 10^2$	$7 * 10^2$	$7 * 10^2$	$7 * 10^2$

\*días después de la aplicación de herbicidas. \*\*unidades formadoras de colonia (UFC  $g^{-1}$ ).

En el tratamiento sin inocular más glifosato, la población de *Azospirillum* se mantuvo en  $7 * 10^2$  y representó un aumento de  $5.5 * 10^2$  más, en comparación con el testigo sin inocular y sin glifosato. Este incremento estimulador inicial ha sido consignado con la aplicación de glifosato (Ratcliff *et al.*, 2006; Zabaloy *et al.*, 2008) y con 2, 4, D (Wardle y Parkinson, 1990). En el tratamiento sin inocular más 2, 4, D, el incremento de la población de *Azospirillum* con respecto al testigo sin herbicida fue menor. La población de *Azospirillum* no varió a través del tiempo con *Azospirillum* y sin glifosato. El glifosato disminuyó la población de *Azospirillum* a las dos semanas y se incrementó en la tercer semanas después de aplicado el tratamiento.

Resultados semejantes citan Wardle y Parkinson (1990) y Zabaloy *et al.* (2008). La población de *Azospirillum* más glifosato en el último muestreo fue la más alta y representó un

herbicidas, the population found was high,  $10^{12}$ , (Table 1). This very same fact was presented with treatment inoculated with 2-4-D amine and the population of *Azospirillum* did not change over time. The changes were presented to the application of glyphosate; *Azospirillum* population increased from the first sampling. At 7 days after application, *Azospirillum* increased by  $0.5 * 10^{12}$  UFC  $g^{-1}$ . Subsequently, at 14 days, the population of the bacteria was lower than the initial, and subsequent sampling increased again at 21 and 28 DAP (Table 1).

The uninoculated treatment plus glyphosate, the population *Azospirillum* remained  $7 * 10^2$  and represented an increase of more than  $5.5 * 10^2$ , compared with uninoculated control without glyphosate. This initial stimulator increase was recorded with glyphosate application (Ratcliff *et al.*, 2006;

Zabaloy *et al.*, 2008) and 2, 4, D (Wardle and Parkinson, 1990). In the uninoculated treatment plus 2, 4, D, increasing the population of *Azospirillum* compared to the control without herbicide was lower. The population of *Azospirillum* did not vary over time with *Azospirillum* without glyphosate. Glyphosate decreased the population of *Azospirillum* at two weeks and increased in the third week after the application of the treatment.

Similar results were cited by Wardle and Parkinson (1990) and Zabaloy *et al.* (2008). The population of *Azospirillum* plus glyphosate in the last sampling was the highest and represented an increase of 100% compared with the treatment applied 2, 4, D. Ratcliff *et al.* (2006) also cited stimulating microbial activity after application of glyphosate as the mineralization C and N, but without affecting the microbial biomass of the soil. In our case, the number of

incremento de 100% en comparación el tratamiento aplicado con 2, 4, D. Ratcliff *et al.* (2006), citan también estimulación de la actividad microbiana después de la aplicación de glifosato, medida por la mineralización de C y N, pero sin afectar la biomasa microbiana del suelo. En nuestro caso, el número de bacterias de *Azospirillum* en el tratamiento inoculado y sin herbicidas, no varió significativamente a lo largo del tiempo, y se mantuvo el orden de  $1 \times 10^{12}$  UFC  $g^{-1}$ .

Algunos autores advierten sobre inhibición del crecimiento diferencial entre cepas de *Azospirillum* a otros herbicidas (Atanassova-Altimirska y Bakalivanov, 2009) y efectos perjudiciales de glifosato en bacterias fijadoras de nitrógeno libres y en la infección y el número de nódulos formados (Newiadowska, 2004). El glifosato es un organofosfonato que se puede utilizar como fuente de P, C o N por cualquiera de las bacterias gram-positivos o gram-negativas (van Eerd *et al.*, 2003). El poco efecto en la disminución de las poblaciones de *Azospirillum* asociadas al trigo beneficia su desarrollo vegetal y permite reducir o controlar las plantas no deseadas asociadas al cultivo, especialmente las dicotiledóneas.

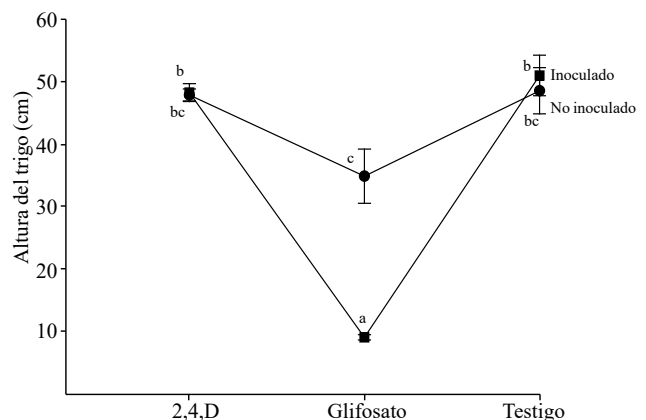
Las plantas inoculadas con *Azospirillum* más glifosato presentaron 15 cm menor tamaño en comparación con el resto de los tratamientos (Figura 1). Se encontró efecto significativo de la interacción entre el factor bacteria y el herbicida aplicado ( $F_{2,90}=9.35$ ,  $p \leq 0.001$ ). La combinación de la inoculación del trigo con *Azospirillum* conjuntamente a la aplicación de glifosato resulta en una disminución significativa en el tamaño de la plantas. La misma tendencia se observó en las plantas no inoculadas, aunque esta diferencia no es significativa (Tukey HSD,  $p > 0.06$ ). Sin embargo, la altura de las plantas no inoculadas y con aplicación de glifosato, sí fueron significativamente de menor tamaño en comparación con las plantas inoculadas y tratadas con 2, 4, D o sin herbicida (Tukey HSD,  $p \leq 0.008$ ).

Se confirma el efecto negativo del glifosato en el crecimiento del trigo. El glifosato es un herbicida de amplio espectro con acción sistémica, que ejerce su acción sobre el crecimiento de las plantas inhibiendo la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esenciales, que son la base para la síntesis de proteínas y genera inhibición del crecimiento (Schuette, 1998). No hubo diferencia significativa entre plantas inoculadas y no inoculadas con *Azospirillum* sin herbicida o con el herbicida 2, 4, D (Tukey HSD,  $p > 0.94$ ). La falta de respuesta en altura de la planta a la inoculación de *Azospirillum* en comparación con las plantas sin inocular,

bacteria in the treatment inoculated *Azospirillum* without herbicide did not vary significantly over time, and was maintained by the order of  $1 \times 10^{12}$  UFC  $g^{-1}$ .

Some authors warn of differential growth inhibition among strains of *Azospirillum* to other herbicides (Atanassova-Altimirska and Bakalivanov, 2009) and harmful effects of glyphosate on free fixing nitrogen bacteria and in the infection and number of nodules formed (Newiadowska, 2004). Glyphosate is an organophosphonate that can be used as a source of P, C or N by either gram-positive or gram-negative bacteria (van Eerd *et al.*, 2003). The little effect in reducing the populations of *Azospirillum* associated with wheat plant development and its benefits can reduce or control unwanted plants associated with the cultivation, especially dicots.

Inoculated plants with *Azospirillum* plus glyphosate, showed 15 cm smaller in size compared with the other treatments (Figure 1). We found a significant effect of the interaction between the bacteria and the applied herbicide factor ( $F_{2,90}=9.35$ ,  $p \leq 0.001$ ). The combination of wheat inoculation with *Azospirillum* plus glyphosate application results in a significant decrease in the size of the plants. The same trend was observed in non-inoculated plants, although this difference is not significant (Tukey HSD,  $p > 0.06$ ). However, the height of the non-inoculated and glyphosate application plants were self significantly smaller compared to the inoculated and treated with 2, 4, D or without herbicide (Tukey HSD,  $p \leq 0.008$ ).



**Figura 1. Efecto de dos tipos de herbicidas y la inoculación de *Azospirillum* en la altura del trigo var. Altiplano en invernadero.** Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 1. Effect of two types of herbicides and inoculation of *Azospirillum* on the height of the wheat var. Altiplano in greenhouse.** Values with different letter are statistically different ( $p \leq 0.05$ ).

puede estar relacionada con la presencia naturalizada de la población de *Azospirillum* encontrada en el sustrato. Asimismo, sin la aplicación de herbicidas y con la aplicación del 2, 4, D, las plantas presentaron la misma altura.

En campo, Arregui *et al.* (2009) citan menor tamaño del trigo sin inocular y con dosis altas de 250 0 500 g ha<sup>-1</sup> de 2, 4, D. Se encontró efecto significativo de la interacción entre el factor bacteria y el herbicida aplicado. El efecto del 2, 4, D, afectó menos el desarrollo de la planta y sobrepasando el posible efecto positivo que pudiera tener la presencia de *Azospirillum*. Para la biomasa se realizó una transformación logarítmica para cubrir los supuestos de normalidad. Se encontró un efecto significativo de la interacción entre el herbicida y la bacteria ( $F_{2,126}=4.198, p=0.02$ , Figura 2).

La biomasa de trigo presentó una tendencia semejante a la altura de las plantas, es decir, menor peso en las plantas inoculadas y no inoculadas más glifosato en comparación con plantas sin herbicidas, y la diferencia no fue significativa Tukey HSD,  $p>0.09$  (Figura 2). Las plantas inoculadas más 2, 4, D, acumularon mayor biomasa en comparación con los otros tratamientos Tukey HSD,  $p<0.03$  (Figura 2). La respuesta anterior sugiere, que el trigo desarrolla mejor con la bacteria más el 2, 4, D. Este comportamiento puede ser el resultado de la combinación de diversos mecanismos de acción que operan de acuerdo al ambiente (Bashan y de-Bashan, 2010).

## Conclusión

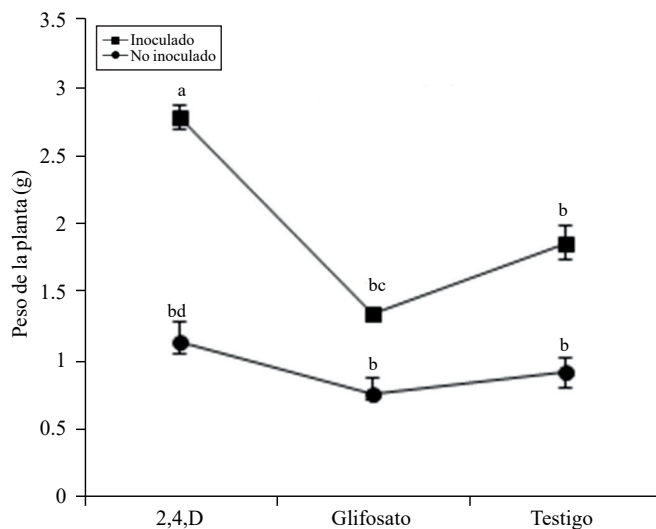
La contribución de la inoculación del trigo con *Azospirillum brasilense* es una alternativa factible para mejorar su desarrollo. La interacción de *A. brasilense* con los dos herbicidas (2, 4, D y glifosato), no afectó de manera significativa a la población de *Azospirillum* presente en la raíz. La inoculación del trigo con *Azospirillum*, con o sin tratamiento con herbicida, registraron mayor biomasa en comparación con las plantas sin inocular y cuando fueron tratadas con el herbicida 2, 4, D, se incrementó su producción de biomasa.

## Literatura citada

- Arregui, M. C.; Scotta, R. R. y Sánchez, D. E. 2009. Fitotoxicidad del barbecho químico en trigo y maíz. *Agrociencia*. 43:595-601.
- Atanassova-Altimirskaja, R. and Bakalivanov, D. 2009. Gardian and pivot herbicide effect on some non-symbiotic nitrogen fixing bacteria. *Biotechnol.* 351-353.

The negative effect of glyphosate on wheat growth is confirmed. Glyphosate is a broad spectrum herbicide with systemic action, which exerts its effects on plant growth by inhibiting the biosynthesis of essential aromatic amino acids, which are the basis for the synthesis of proteins and generates growth inhibition (Schuette, 1998). There was no significant difference between inoculated and non-inoculated plants with *Azospirillum* without herbicide or herbicide 2, 4, D (Tukey HSD,  $p>0.94$ ). The lack of response in plant height of *Azospirillum* inoculation compared to uninoculated plants may be related to the presence of naturalized population of *Azospirillum* found in the substrate. Moreover, without the application of herbicides and the application of 2, 4, D, the plants showed the same height.

On the field, Arregui *et al.* (2009) cited smaller sized wheat uninoculated and high dose 250 0 500 g ha<sup>-1</sup> of 2, 4, D. We found a significant effect on the interaction between the bacteria and the herbicide applied. The effect of 2, 4, D, affected less the plant development and surpassing the possible positive effects that might have the presence of *Azospirillum*. For biomass, we performed a logarithmic transformation to meet the assumptions of normality. A significant effect of the interaction between the herbicide and the bacteria was found ( $F_{2,126}=4.198, p=0.02$ , Figure 2).



**Figura 2.** Peso seco de *Triticum aestivum* L. var. Altiplano con *Azospirillum* en interacción con dos herbicidas en invernadero. La línea vertical indica  $\pm$  el error estándar de nueve repeticiones. Valores con diferente letra dentro son estadísticamente diferentes (Tukey HSD,  $p\leq0.05$ ).

**Figure 2.** Dry weight of *Triticum aestivum* L. var. Altiplano with *Azospirillum* interacting with two herbicides in greenhouse. The vertical line indicates  $\pm$  standard error of nine repetitions. Values with different letter within are statistically different (Tukey HSD,  $p\leq0.05$ ).

- Bashan, Y. and de-Bashan Luz, E. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth- a critical assessment. *Adv. Agron.* 108:77-136.
- Cárdenas, D. M.; Garrido, M. F.; Bonilla, R. R. y Baldani, V. L. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. En pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes.* 33(3):285-300.
- Chakravarty, P. and Chatarpaul, L. 1990. Non-target effect of herbicides. I. Effect of glyphosate and hexazinone on soil microbial activity. Microbial population, and *in-vitro* growth of ectomycorrhizal fungi. *Pestic. Sci.* 28, 233-241.
- Díaz-Zorita, M. and Fernandez-Canigia, M. V. 2009. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.* 45:3-11.
- Haney, R. L.; Senseman, S. A. and Hons, F. M. 2002. Effect of roundup ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *J. Environ. Qual.* 31(3):730-735.
- Niewiadomska, A. 2004. Effect of carbendazim, imazetapir and thiram on nitrogenase activity, the number of microorganisms in soil and yield of red clover (*Trifolium pratense* L.) *Polish J. Environ. Studies.* 13(4):403-410.
- Ratcliff, W.A.; Busse, D. M. and Shestak, J. C. 2006. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34:114-124.
- Schuette J. 1998. Environmental fate of glyphosate. Environmental monitoring and pest management. Department of pesticides regulation. Sacramento, CA. 13 p.
- van Eerd, L. L.; Hoagland, R. E.; Zablotowicz, R. M. and Hall, J. C. 2003. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Sci.* 51:472-495.
- Wardle, D. A. and Parkinson, D. 1990. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant Soil.* 122:29-37.
- Zabaloy, C. M.; Garland, L. J. and Gómez, M. A. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 40:1-12.

The biomass of wheat showed a similar trend to the height of the plants, that is, less weight in inoculated plants and, uninoculated plus glyphosate, compared to the plants without herbicide, and the difference was not significant Tukey HSD,  $p > 0.09$  (Figure 2). The inoculated plants plus 2, 4, D, accumulated more biomass compared to the other treatments Tukey HSD,  $p < 0.03$  (Figure 2). This response suggests that, wheat with the bacteria plus 2, 4, D grows best. This behaviour may be the result of the combined action of various operating mechanisms according to the environment (Bashan and de-Bashan, 2010).

## Conclusions

The contribution of wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* is a feasible alternative for improving growth. The interaction of *A. brasilense* with both herbicides (2, 4, D and glyphosate), did not significantly affected the population of *Azospirillum* in the root. Inoculation of wheat with *Azospirillum*, with or without treatment with herbicide, showed increased biomass compared to uninoculated plants and, when treated with the herbicide 2, 4, D, the biomass production was increased.

*End of the English version*

