



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS “DR. JESÚS
CABALLERO MELLADO”.

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS – ICUAP

**“Aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal con
capacidad para utilizar glifosato de suelos agrícolas de la región de
Nealtican, Pue.”**

TESIS

Para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Eduardo Romero de la Rosa

Director de Tesis: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández

Co-asesora: M.C. Teresita Jiménez Salgado

Puebla, Pue. Enero, 2024.

Contenido

Introducción.....	5
Planteamiento del problema.....	8
Justificación.....	9
Objetivos	10
General	10
Particulares.....	10
Hipótesis	10
Capítulo 1: Antecedentes	11
Suelo	11
Propiedades del suelo.....	12
Pesticidas.....	12
Herbicidas	13
Época de aplicación	14
Selectividad	14
Tipo de acción	15
Familia química.....	15
Modo de acción	15
Glifosato	18
Efecto del glifosato en el ambiente.....	18
Efecto del glifosato en la salud	19

Biorremediación	20
Fitorremediación	21
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	22
Capítulo 2: Metodología.....	25
Recolección de muestra	25
Análisis de fisicoquímico del suelo.....	26
Cuantificación de poblaciones microbianas, aislamiento e identificación de cepas ...	26
Cuantificación de la población microbiana.....	26
Aislamiento e identificación de cepas bacterianas	26
Concentración mínima inhibitoria (CMI) al glifosato de las cepas aisladas	27
Uso de glifosato como fuente de carbono y/o nitrógeno	27
Producción de auxinas	28
Inoculación de frijol con las cepas aisladas	29
Capítulo 3: Resultados y discusión	30
Caracterización del suelo	30
Conteo de poblaciones microbianas	31
Aislamiento e identificación de cepas bacterianas	32
Evaluación concentración mínima inhibitoria	36
Uso de glifosato como fuente de carbono y/o nitrógeno	38
Capacidad en la producción de auxinas	41
Inoculación de semillas de frijol.....	42

Efecto del glifosato a diferentes concentraciones en semillas de frijol inoculadas.....	46
Conclusiones.....	51
Bibliografía	52
Anexos	60

Introducción

El sistema climático de la Tierra, incluye la superficie terrestre, la atmósfera y los océanos. Muchos aspectos del clima global están cambiando rápidamente y los principales impulsores del cambio son de origen antropogénico. A pesar de la dificultad para predecir los efectos del calentamiento global debido a la gran complejidad del sistema, los modelos climáticos desarrollados por el Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC por sus siglas en inglés Intergovernmental Panel on Climate Change) muestran un aumento inequívoco de la temperatura global promedio en rangos de 2.6 a 4.8 °C en el siglo XXI, si las emisiones de gases de efecto invernadero continúan al ritmo actual. (Gatto et al., 2016).

El cambio climático global se asocia principalmente con niveles crecientes de CO₂ y eventos climáticos extremos que involucran alteraciones significativas en la temperatura y las precipitaciones. Se considera que estos factores, tienen el efecto más significativo en la producción agrícola futura, que impactará los rendimientos de los cultivos más importantes. Las predicciones sugieren que los rendimientos mundiales de trigo, maíz y soja disminuirán entre un 6% y un 16% por cada °C de aumento en la temperatura global. (Matzafri, 2018).

Anualmente, se utilizan alrededor de 2 600 millones de libras de pesticidas para fines específicos, como la eliminación y/o la desaceleración en el crecimiento de organismos dañinos, la eliminación de plantas no deseadas, el control de gérmenes y de insectos. Pesticida es el nombre genérico que se les da a los compuestos que tienen como objetivo un blanco específico y se clasifican como: insecticidas, herbicidas fungicidas, rodenticidas, acaricidas, nematocidas. (Akashe et al., 2018). Aproximadamente, el 80% de estos pesticidas se utilizan para mejorar la competencia agrícola, mientras que el 20% restante se utiliza principalmente para la salud comunitaria en la disuasión, moderación y destrucción de enfermedades y plagas. (Ukhurebor et al., 2021).

Para cuantificar los impactos ambientales y en la salud humana, derivados del uso de pesticidas, es esencial saber cuánto pesticida se está aplicando en una región y en un cultivo

determinado. Los datos deberían estar disponibles dependiendo del cultivo, método de aplicación, número de aplicaciones, formulación aplicada y volumen total aplicado por hectárea, desafortunadamente, estos datos rara vez son recolectados. (Brenbook, 2016).

El glifosato es un herbicida no selectivo, introducido en 1974 por Monsanto, para su uso en agricultura y para el control de la vegetación en zonas industriales. El herbicida se usa comúnmente en campos, huertos, viñedos, a lo largo de cercas, etc. La expiración de la patente de Roundup en 2000 fue seguida por un uso aún mayor del ingrediente activo del herbicida, con productos genéricos de diferentes formulaciones ahora fabricados por numerosas empresas. Hoy en día es el herbicida más utilizado en todo el mundo. (Beckie et al., 2020). La función del glifosato es evitar que las plantas produzcan aminoácidos aromáticos esenciales (fenilalanina, triptófano, tirosina) para su desarrollo. (Borggaard & Gimsing, 2008). En México el glifosato es el herbicida más utilizado y comprende el 45% del mercado. (Alcántara et al., 2021).

La biorremediación se ha convertido en una de las principales tecnologías de restauración ambiental, utilizando microorganismos para reducir la concentración y toxicidad de varios contaminantes químicos, tales como hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, ésteres de ftalato, compuestos nitroaromáticos, solventes, pesticidas y metales pesados. Actualmente, es uno de los métodos más seguros y rentables para la descontaminación y desintoxicación de un ambiente contaminado con pesticidas. (Gavrilescu, 2005).

La permanencia de los pesticidas en el ambiente está influenciada por la actividad microbiana, generalmente, estos organismos parecen ser los agentes de biorremediación más eficientes. Algunos pesticidas son fácilmente degradados por microorganismos, mientras que otros han demostrado ser recalcitrantes. (Gavrilescu, 2005).

En el presente trabajo se aislaron bacterias de un suelo agrícola contaminado con glifosato con la capacidad de emplearlo como fuente de nitrógeno, además se determinó su

resistencia al contaminante y se evaluó la producción de auxinas por parte de las cepas bacterianas aisladas.

Planteamiento del problema

Los pesticidas son sustancias químicas que se han empleado con la finalidad de controlar, matar o repeler plagas, para asegurar la producción agrícola, sin embargo, el uso indiscriminado de estas sustancias ha causado un enorme daño al ambiente debido a su persistencia prolongada y su difícil eliminación. Otra consecuencia son los daños ocasionados a la salud de las personas que puede deberse a la exposición durante su aplicación.

El uso de pesticidas aplicados principalmente en actividades agrícolas, han ocasionado daños al ambiente; al contaminar el suelo puede provocar la pérdida de fertilidad, afectando también las poblaciones microbianas benéficas; pueden llegar al aire por la volatilización de compuestos y su dispersión hacia la atmósfera; y a las aguas superficiales y subterráneas por los lixiviados e infiltración. (Dhananjayan et al., 2019).

En México, la venta y uso de pesticidas está regulado por diversas normas y leyes, sin embargo, en ninguna se hace referencia a los límites máximos permisibles en los suelos. La gran variedad de productos comerciales disponibles ha permitido a los agricultores aplicar estos productos de manera indiscriminada en sus cultivos sin conocer los efectos adversos que estos conllevan. Las aplicaciones y el uso no controlado han ocasionado concentraciones elevadas en los ecosistemas.

El glifosato es el herbicida más utilizado en el mundo, en agricultura, silvicultura y jardinería. El impacto hacia la salud humana y al ambiente debido a la toxicidad de este herbicida, han hecho que el gobierno de México reduzca gradualmente su uso y comercialización hasta su total prohibición en 2024. (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACYT], 2022).

Una alternativa desarrollada para la eliminación de los pesticidas en el ambiente es la biorremediación, la cual aprovecha las capacidades metabólicas de diferentes organismos para lograr la degradación, remoción y transformación de los contaminantes.

Justificación

En los últimos años el incremento mundial de la población ha ocasionado una mayor demanda en alimentos, para poder satisfacer esta demanda se ha recurrido al uso de agroquímicos (pesticidas y fertilizantes).

Los pesticidas pertenecen a un grupo de compuestos químicos que se usan en el control de plagas que afectan la producción agrícola, pero su aplicación, sobre todo cuando es de forma inadecuada, contamina agua, suelos y aire, daña a los organismos, altera la inocuidad de los alimentos destinados para consumo y, en consecuencia, incrementa los riesgos para la salud humana.

Una gran cantidad de agroquímicos altamente tóxicos permanecen actualmente dispersos en el medioambiente debido a sus características de alta persistencia, lenta degradación y alta estabilidad química. Es importante comprender sus efectos potenciales para reducir los riesgos a la salud humana y al medioambiente. (Polanco et al., 2019).

Se ha considerado que la degradación del glifosato en suelos es un proceso microbiológico. (Borggaard & Gimsing, 2008). La principal forma de eliminación de glifosato en los suelos es su biodegradación por los sistemas enzimáticos de algunos microorganismos. La mineralización de este herbicida depende de su biodisponibilidad y la actividad de la población microbiana. La degradación de glifosato puede verse afectada debido a su movilidad vertical en los suelos como resultado de riegos y precipitaciones atmosféricas. Esto fue confirmado por la detección de glifosato en el subsuelo, aguas subterráneas y en horizontes más profundos del suelo. (Ermakova et al., 2010).

Se busca un sistema de agricultura más seguro, sano y respetuoso con el ambiente, dando como alternativa la rotación de cultivos, la aplicación de biopesticidas y biofertilizantes. Por esto, se buscan bacterias capaces de resistir altas concentraciones de glifosato y que tengan la capacidad de utilizarlo como fuente de carbono o de nitrógeno, además de evaluar su capacidad en la promoción del crecimiento vegetal.

Objetivos

General

Aislar cepas bacterianas de suelos agrícolas con capacidad de utilizar al glifosato para su crecimiento y promover el crecimiento vegetal.

Particulares

Identificar cepas bacterianas resistentes al glifosato en un suelo agrícola.

Evaluar la concentración mínima inhibitoria de glifosato de las cepas aisladas.

Determinar la capacidad de las cepas aisladas para utilizar el glifosato como fuente de carbono y/o nitrógeno.

Evaluar las cepas aisladas sobre la producción de auxinas y capacidad de promoción de crecimiento en cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Hipótesis

En un suelo contaminado con herbicidas existirán poblaciones bacterianas con la capacidad de utilizar el glifosato como fuente de carbono o de nitrógeno y a su vez promover el crecimiento vegetal.

Capítulo 1: Antecedentes

Suelo

El suelo constituye uno de los recursos no renovables más importantes para la vida en el planeta, ya que es la base fundamental para la explotación agropecuaria y forestal. Es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, fundamental e irremplazable, desarrollado a partir de una mezcla de materia orgánica, minerales y nutrientes capaces de sostener el crecimiento de los organismos y los microorganismos. Su formación es un proceso complejo que involucra cambios físicos, químicos y biológicos de la roca originaria. Los físicos implican la reducción del tamaño de las partículas sin ninguna alteración en su composición, y son causados por la lluvia y otros factores ambientales. Los químicos son originados por la separación de las partículas minerales de las rocas; su alteración o destrucción y la resíntesis a compuestos sólidos estables se deben principalmente, a la acción del agua, el oxígeno, el dióxido de carbono y los compuestos orgánicos. Por su parte, los cambios biológicos son realizados por la comunidad que habita en el suelo: flora (plantas), macrofauna (invertebrados), mesofauna (artrópodos, anélidos, nematodos y moluscos), microfauna (protozoos y algunos nematodos) y microbiota (bacterias, actinomicetos, hongos y algas). (García et al., 2012).

Los suelos como parte de los ecosistemas y de los agroecosistemas, prestan importantes funciones o servicios que los mantienen y que apoyan las actividades sociales y económicas de las personas (Burbano, 2016). Entre las funciones más importantes del suelo esta:

Producción de alimentos: la más evidente de las funciones del suelo es el soporte y suministro de nutrientes para las plantas a fin de producir alimentos y biomasa en general.

Almacenamiento o fijación de carbono: el suelo es el mayor sumidero de carbono en la naturaleza. La fijación del carbono por el suelo, llamada “secuestro de carbono” o “captura de carbono”, impide que el CO₂ vaya a la atmósfera.

Soporte de las actividades humanas y fuente de materias primas: sobre el suelo se realizan actividades industriales, se habilitan zonas residenciales y de infraestructura turística, se

construyen carreteras y otras obras civiles. También, suministra materias primas como turba, grava, arena, arcilla o rocas, utilizadas en varios procesos productivos.

Propiedades del suelo

Textura: se considera una de las propiedades físicas más importantes. La textura es la proporción de tres partículas minerales, arena, limo y arcilla, en un suelo. Estas partículas se distinguen por su tamaño y constituyen la fracción mineral fina. (McCauley et al., 2005).

pH: se refiere a la acidez o alcalinidad de un suelo y es la medida de los iones de hidrógeno (H^+) presentes en el suelo. Una cantidad alta de H^+ corresponde a un valor de pH bajo y viceversa. La escala de pH varía de aproximadamente 0 a 14, siendo 7 neutral, por debajo de 7 ácido y por encima de 7 alcalino (básico). El pH del suelo puede afectar la Capacidad de Intercambio Catiónico, (CIC). (McCauley et al., 2005).

Materia orgánica: aumenta el poder de retención de agua en los suelos, disminuye las pérdidas por escorrentía, mejora la aireación y produce una mejor estructura del suelo, promueve la formación de agregados, reduce considerablemente la erosión. La materia orgánica mejora químicamente el suelo sirviendo como almacén o suministro de nutrientes para las plantas. (Murphy, 2015).

Pesticidas

Los pesticidas son cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger

el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte. (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 1990).

Dada la gran cantidad de familias químicas implicadas, la clasificación de los pesticidas resulta difícil. Un recurso útil es clasificarlos en función de las plagas sobre las que actúan (tabla1). Otra posibilidad es hacer una clasificación en relación con la familia química, que suministra mayor información sobre su toxicidad. En general, se tiende a hacer una clasificación mixta por ambos criterios. (Ferrer, 2003).

Tabla 1. Clasificación de pesticidas basada en la plaga objetivo.

Tipo de pesticida	Plaga objetivo
Acaricida	Ácaros
Bactericida	Bacterias
Fungicida	Hongos
Herbicida	Malas hierbas
Insecticida	Insectos
Nematicida	Nematodos
Rodenticida	Roedores

Fuente: Ubabakar et al., 2020.

El método más común y útil para clasificar los pesticidas se basa en su composición química y la naturaleza de los ingredientes activos. Es este tipo de clasificación la que da la pista sobre la eficacia, las propiedades físicas y químicas de los pesticidas. Esta información es muy útil para determinar el modo de aplicación, las precauciones que deben tomarse durante la aplicación y las tasas de aplicación. Según la composición química, los pesticidas se clasifican en cuatro grupos principales, organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides. (Yadav & Devi, 2017).

Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos que afectan negativamente el crecimiento normal de las plantas, actúan rápidamente y pueden aplicarse en un área específica o donde no son posibles otros métodos de control. (Qasem, 2011). Son usados extensivamente en la agricultura,

industria y en zonas urbanas, dado que si se emplean adecuadamente proporcionan un control eficiente de maleza a un bajo costo. No obstante, un manejo incorrecto de estos puede provocar daños a las plantas cultivadas, al medio ambiente, e incluso a las personas que los aplican. (Rosales y Esqueda, 2006).

Los herbicidas se clasifican en función de diferentes factores entre los que destacan: época de aplicación, selectividad, tipo de acción, familia química y modo de acción. (Rosales y Esqueda, 2006).

Época de aplicación

De acuerdo al periodo de su aplicación los herbicidas se clasifican como pre-emergentes (PRE) y post-emergentes (POST). Los herbicidas PRE se aplican después de la siembra, pero antes de que emerjan la maleza y el cultivo, se requiere de un riego moderado para que el herbicida se sitúe en los primeros 5 cm de profundidad del suelo, elimina a las malas hierbas en proceso de germinación o recién emergidas, lo cual evita la competencia temprana con el cultivo, presentan interacciones con propiedades del suelo como son: textura, pH y materia orgánica que pueden afectar la cantidad de herbicida disponible en el suelo. El cálculo de las dosis dependerá de la clase textural del suelo y el contenido de materia orgánica. (Rosales y Esqueda, 2006).

Los herbicidas POST se emplean después de la emergencia del cultivo y la maleza, principalmente en malezas en sus primeras etapas de desarrollo cuando son más susceptibles a los herbicidas y su competencia con el cultivo es mínima, se aplican en zonas específicas donde existe presencia de malezas. (Rosales y Esqueda, 2006).

Selectividad

Con base en su selectividad los herbicidas se clasifican como: selectivos, herbicidas que a ciertas dosis, formas y épocas de aplicación eliminan algunas plantas sin dañar significativamente a otras. No selectivos: aquellos herbicidas cuya toxicidad afecta toda clase de

vegetación, se utilizan en terrenos sin cultivo y evitando el contacto con plantas cultivadas, el glifosato es un ejemplo de herbicida no selectivo. (Rosales y Esqueda, 2006).

Tipo de acción

Por su tipo de acción los herbicidas pueden ser: De contacto, herbicidas que eliminan las partes de la planta con las que tuvo contacto y tienen un transporte limitado en la planta. Sistémicos: herbicidas que se aplican sobre el follaje, al ser transportados afectan todas las partes de las plantas. (Rosales y Esqueda, 2006).

Familia química

Los herbicidas se clasifican con base en la familia química de los diferentes compuestos empleados en la formulación de estos productos. Las familias químicas poseen propiedades químicas similares y generalmente presentan el mismo modo de acción. Principales familias químicas de herbicidas: triazinas, dinitroanilinas, fenoxiacéticos, cloroacetamidas, ciclohexanodionas, sulfonilureas y bipyridilos. (Rosales y Esqueda, 2006).

Modo de acción

Son los eventos que ocurren desde la absorción del herbicida hasta la muerte de la planta. Los herbicidas con el mismo modo de acción comparten mecanismos de absorción y transporte, producen síntomas similares en las plantas tratadas. Además, el modo de acción permite predecir, la época de aplicación, selectividad a cultivos y persistencia en el suelo, del mismo modo permite diseñar programas de control químico de malezas, evitar la residualidad en el suelo y prevenir la aparición de malezas resistentes. (Rosales y Esqueda, 2006). A continuación, se explicarán las subcategorías del modo de acción.

- 1) Reguladores del crecimiento. Incluyen a las familias químicas: fenoxicarboxílicos, benzóicos, piridincarboxílicos y quinolincarboxílicos. El modo de acción incluye la epinastia o retorcimiento de pecíolos y tallos, la formación de callosidades, la malformación de hojas y finalmente la necrosis y muerte de la planta. El tiempo requerido para la eliminación de malezas es de 2 semanas, son absorbidos por las

hojas y raíces, su uso es en post-emergencia y son selectivos. Pueden ser transportados impactando cultivos sensibles, por lo que se deben utilizar con precaución. (Rosales y Esqueda, 2006).

- 2) Inhibidores del crecimiento de plántulas. Actúan sobre plántulas germinadas y se aplican antes de que emerjan, presentan poca actividad foliar. Se dividen en dos grupos: inhibidores de radículas e inhibidores de brotes. (Rosales y Esqueda, 2006).

Inhibidores de radículas. Incluyen a las dinitroanilinas, que inhiben el desarrollo de radículas, las plantas mueren por no poder adquirir agua y nutrientes del suelo, inhibición en la división celular, se absorben por los brotes y raíces y presentan poco o nulo transporte dentro de las plantas.

Inhibidores de brotes. Incluyen a las familias químicas de las cloroacetamidas, los tiocarbamatos y ácidos benzoicos. El modo de acción de estos herbicidas es la inhibición en el desarrollo de plántulas en proceso de emergencia. Afectan la síntesis de lípidos y proteínas en las plántulas.

- 3) Inhibidores de la fotosíntesis. Se clasifican en dos grupos: móviles o sistémicos y herbicidas no-móviles o de contacto. Los inhibidores móviles incluyen a las triazinas, triazinonas, triazolinonas, fenilureas y uracilos, el modo de acción se caracteriza por la clorosis intervenial, o amarillamiento entre las nervaduras, que termina en necrosis, ya que interfieren en el transporte de electrones en el fotosistema II. Los inhibidores de contacto incluyen a los nitrilos, benzotiadizoles y amidas, el modo de acción se puede observar por clorosis que se transforma rápidamente en necrosis del tejido tratado. Ambos tipos de inhibidores tienen una residualidad limitada en el suelo. (Rosales y Esqueda, 2006).

- 4) Inhibidores de la síntesis de pigmentos. Este grupo incluye a las familias químicas: isoxazolidinonas, triazoles, isoxazoles y piridazinonas, inhiben la formación de carotenoides en las plantas que resulta en la destrucción de la clorofila, las plantas

mueren por no poder realizar la fotosíntesis debido a la ausencia de clorofila. Las raíces absorben y transportan estos herbicidas por el xilema hasta la parte aérea, son aplicados en PRE y POST emergencia, presentan alta residualidad en el suelo. (Rosales y Esqueda, 2006).

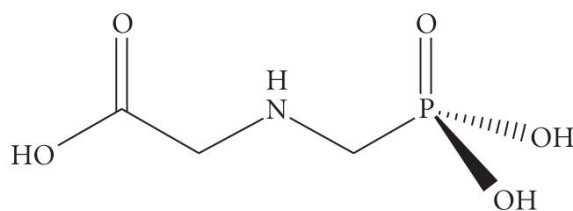
- 5) Inhibidores de la síntesis de lípidos. Incluyen a las familias químicas: ariloxifenoxipropionatos y ciclohexanodionas. Actúan sólo sobre gramíneas y su modo de acción es la interrupción del crecimiento. El mecanismo de acción es la inhibición de la enzima Acetil Coenzima-a carboxilasa en la síntesis de lípidos. Son usados principalmente POST emergencia, se requiere la adición de un surfactante o aceite agrícola para incrementar su absorción en las plantas. (Rosales y Esqueda, 2006).
- 6) Inhibidores de la síntesis de aminoácidos. Se dividen en inhibidores de aminoácidos ramificados e inhibidores de aminoácidos aromáticos. (Rosales y Esqueda, 2006).
Inhibidores de aminoácidos ramificados. Incluyen las familias químicas: sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidinas y pirimidiniltiobenzoatos. El mecanismo de acción es la inhibición de la enzima Acetolactato sintasa (ALS) provocando que no se sinteticen los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, ocasionando que la planta no pueda producir proteínas y muera, presentan una alta residualidad en el suelo.
Inhibidores de aminoácidos aromáticos. En este grupo sólo se presenta el glifosato, herbicida postemergente y no selectivo, el mecanismo de acción del glifosato es la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintetasa (EPSP, por sus siglas en inglés) en el ciclo metabólico del ácido shikimico y bloquea la producción de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano.
- 7) Destruidores de membranas celulares. Incluyen a las familias químicas: bupiridilos, difenileters, aril triazolinonas y fenil-phthalimidias. Su acción principal es de contacto en postemergencia y son activados al exponerse a la luz para formar compuestos a partir del oxígeno como el oxígeno simple, el radical libre de hidroxilo y el peróxido de

hidrógeno. Estos compuestos destruyen las membranas celulares rápidamente y causan la necrosis de los tejidos. (Rosales y Esqueda, 2006).

Glifosato

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina, con un peso molecular de 228,18 g/mol, es un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil- shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteínas y minimiza su desarrollo. (Salazar y Aldana, 2011).

Figura 1. Estructura química del glifosato



Fuente: Prasad et al., 2009.

Es el herbicida más usado en todo el mundo; fue introducido al mercado por la empresa Monsanto en 1974 con su formulación más conocida, Roundup. En 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasificó como probable carcinógeno para humanos, se demostró que este herbicida puede operar a través de dos características: genotoxicidad (daño en el Ácido Desoxirribonucleico, ADN) y estrés oxidativo (daño celular por la presencia de radicales libres). (CONACYT, 2020).

Efecto del glifosato en el ambiente

Los herbicidas que contienen glifosato pueden contaminar los suelos. El glifosato se adsorbe en la arcilla y la materia orgánica, lo que ralentiza su degradación por parte de los microorganismos del suelo y conduce a la acumulación en los suelos con el tiempo. Dependiendo

de la composición del suelo, la vida media de puede variar desde días hasta varios meses. (Richmond, 2018). Como resultado, el glifosato y su producto de degradación AMPA pueden persistir durante más de un año en suelos con alto contenido de arcilla, pero pueden desaparecer rápidamente de los suelos arenosos. La degradación de glifosato y AMPA también depende en gran medida del pH del suelo. (Van Bruggen, 2018). La movilidad aumenta un poco a pH alto y con niveles altos de fosfato inorgánico. En la mayoría de los suelos, la lixiviación es muy limitada en comparación con otros herbicidas y el glifosato no es volátil. (Cerqueira & Duke, 2006).

En el pasado, el glifosato no se consideraba un problema para las aguas subterráneas y superficiales, porque tiene un potencial relativamente bajo para moverse a través del suelo y contaminar las fuentes de agua. Sin embargo, a pesar de su unión a la arcilla y la materia orgánica, partes del glifosato y su metabolito AMPA terminan disueltos en aguas subterráneas después de fuertes lluvias. La lluvia y la erosión también pueden transportar partículas del suelo con glifosato y AMPA a las aguas superficiales, donde pueden permanecer en partículas o disolverse. El glifosato y el AMPA disueltos en el agua superficial pueden absorberse en el sedimento del fondo. La biodegradación del glifosato es mucho más lenta en los sedimentos que disuelto en agua. (Van Bruggen, 2018).

Los herbicidas pueden contaminar el aire por deriva (movimiento de gotas que contienen herbicida rociadas a sitios no deseados) o volatilidad. El glifosato esencialmente no es volátil a 25°C y no ha sido reportado como contaminante atmosférico. La mayoría de los herbicidas se aplican mediante aspersión, lo que provoca el movimiento a sitios y organismos no objetivo a través del aire. Los efectos de la deriva de herbicidas en cultivos no deseados y otra vegetación han sido un problema desde que comenzó el uso de herbicidas sintéticos potentes. (Cerqueira & Duke, 2006).

Efecto del glifosato en la salud

El estudio de Roundup en cultivos de células humanas muestra un aumento en la actividad del citocromo P 450. Se informó que la formulación causaba problemas durante el

embarazo. La exposición al glifosato causa arritmia, hipotensión, recaída mental e insuficiencia renal y respiratoria. La intoxicación con glifosato causa shock cardiovascular, impedimento hemodinámico, coagulación intravascular, infarto de miocardio y falla multiorgánica. La evaluación de la toxicidad del glifosato reveló la interrupción de un receptor de andrógenos. Se observa daño en el ADN y también se producen efectos citotóxicos. Se ha informado que los herbicidas a base de glifosato causan efectos crónicos como efectos hepatorrenales, teratogénicos y alteración de la funcionalidad endocrina. (Singh et al., 2020).

Los riesgos para la salud humana asociados con el glifosato han sido evaluados tanto por investigadores académicos como por agencias reguladoras. Una amplia gama de trastornos y enfermedades asociadas a formulaciones a base de glifosato son: alteraciones metabólicas, daño en el ADN, daño renal, toxicidad para la reproducción, condiciones mentales como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, Alzheimer, Parkinson, enfermedad celíaca, autismo, síndrome del intestino permeable, cánceres, etc. Se ha establecido que el glifosato es tóxico solo en altas concentraciones. (Meftaul et al., 2020).

Biorremediación

La biorremediación es el uso de organismos vivos, principalmente microorganismos, para degradar los contaminantes ambientales en formas menos tóxicas. Utiliza bacterias, hongos y plantas para eliminar sustancias peligrosas para la salud humana y el medio ambiente. Los microorganismos pueden ser autóctonos de un área contaminada o pueden aislarse de otro lugar y llevarse al sitio contaminado. Los compuestos contaminantes son transformados por los organismos vivos a través de reacciones que tienen lugar como parte de sus procesos metabólicos. (Vidali, 2001).

La tecnología de biorremediación utiliza microorganismos para reducir, eliminar, contener o transformar contaminantes presentes en suelos, sedimentos, agua y aire. Se describe como el uso de microorganismos para destruir o inmovilizar contaminantes. Este proceso de

desintoxicación tiene como objetivo la reducción químicos dañinos por mineralización, transformación o alteración. (Adams et al., 2015).

En las últimas dos décadas, se han logrado avances en técnicas de biorremediación con el objetivo de restaurar de manera efectiva los ambientes contaminados con un enfoque ecológico y a un costo muy bajo. Los investigadores han desarrollado y modelado diferentes técnicas de biorremediación; sin embargo, debido a la naturaleza y/o al tipo de contaminante, no existe una técnica única de biorremediación que sirva para restaurar los ambientes contaminados. Los microorganismos autóctonos (indígenas) presentes en ambientes contaminados son la clave para resolver la mayoría de los desafíos asociados con la biodegradación y biorremediación de sustancias contaminantes. (Azubuike et al., 2016).

Las técnicas de biorremediación se pueden clasificar como: *ex situ* o *in situ*. La naturaleza del contaminante, la profundidad y el grado de contaminación, el tipo de ambiente, la ubicación, el costo son algunos de los criterios de selección que se consideran al elegir cualquier técnica de biorremediación. Además de los criterios de selección, los criterios de rendimiento (concentraciones de oxígeno y nutrientes, temperatura, pH y otros factores abióticos) que determinan el éxito de los procesos de biorremediación. (Azubuike et al., 2016).

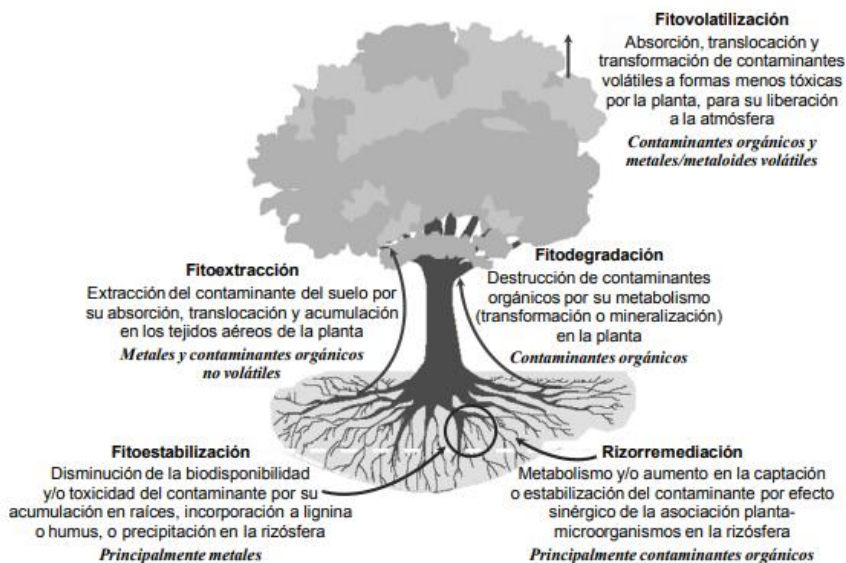
Fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología ecológica novedosa que utiliza plantas especializadas y microorganismos del suelo asociados para eliminar, destruir, secuestrar o reducir las concentraciones o los efectos tóxicos de los contaminantes en el ambiente, especialmente en el suelo y el agua. Esta tecnología depende de la capacidad tanto de la planta como de los microorganismos asociados para adaptarse o sobrevivir en entornos contaminados. (Alori, 2015). En este proceso se busca la eliminación de metales, pesticidas, solventes, explosivos, petróleo crudo y sus derivados. (Grijalbo et al., 2015).

La fitorremediación, es una técnica que se beneficia de las plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos,

lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación y la fitoestabilización. (Agudelo et al., 2005).

Figura 2. Mecanismos de fitorremediación.



Fuente: Peralta y Volke, 2012.

Los mecanismos y la eficiencia de la fitorremediación dependen del tipo de contaminante, biodisponibilidad y propiedades del suelo. Hay varias formas en que las plantas limpian o remedian los sitios contaminados. La absorción de contaminantes en las plantas se produce principalmente a través del sistema radicular, en el que se encuentran los principales mecanismos para prevenir la toxicidad. El sistema radicular proporciona una enorme superficie que acumula agua y nutrientes esenciales para el crecimiento. (Etim, 2012).

Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

El suelo está repleto de formas de vida microscópicas que incluyen bacterias, hongos, actinomicetos, protozoos y algas. Se sabe que el suelo alberga una gran cantidad de bacterias (alrededor de 10^8 a 10^9 células por gramo de suelo). Sin embargo, en suelos ambientalmente estresados, el número de bacterias cultivables puede ser tan bajo como 10^4 células por gramo de suelo. Tanto el número como el tipo de bacterias que se encuentran en diferentes suelos

están influenciados por las condiciones del suelo, incluida la temperatura, la humedad y la presencia de productos químicos, así como por el número y tipos de plantas que se encuentran en esos suelos. Además, las bacterias generalmente no se distribuyen uniformemente en el suelo. Es decir, la concentración de bacterias que se encuentra alrededor de las raíces de las plantas (en la rizosfera) suele ser mucho mayor que en el resto del suelo. Esto se debe a la presencia de nutrientes que incluyen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y otras moléculas pequeñas de los exudados de las raíces de las plantas que pueden representar hasta un tercio del carbono que fija una planta. (Glick, 2012).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), (del inglés Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB)), incluyen aquellas que forman relaciones simbióticas específicas con las plantas, bacterias endófitas que pueden colonizar algunos o una porción de los tejidos interiores de una planta y cianobacterias. Las BPCV pueden promover el crecimiento de las plantas directamente, facilitando la adquisición de recursos o modulando los niveles de hormonas vegetales, o indirectamente, al disminuir los efectos inhibitorios de agentes patógenos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. (Glick, 2012).

Las BPCV pertenecen a un grupo heterogéneo y beneficioso de microorganismos que se pueden encontrar en la rizosfera, en la superficie de la raíz o asociados a ella, son capaces de potenciar el crecimiento de las plantas y protegerlas de enfermedades. (Souza et al., 2015). Desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia al estrés ambiental y, en general, al mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos. Estas bacterias están asociadas a muchas de las especies de plantas que están presentes en la mayoría de los ambientes y se encuentran ampliamente representadas en cuanto a géneros microbianos, pudiendo aumentar la disponibilidad de nutrientes, transformarlos a formas asimilables por la planta, producir sustancias promotoras del crecimiento (fitohormonas) o servir como control biológico de fitopatógenos. (Rives et al., 2007).

El mecanismo más utilizado para explicar los efectos positivos de las BPCV en el crecimiento de las plantas es su capacidad para producir auxinas. Alrededor del 80% de los microorganismos de la rizosfera podían sintetizar y liberar auxinas como metabolito secundario. Una gran cantidad de auxinas conocidas se encuentran naturalmente, destacándose el ácido indol-3-acético (IAA) como el más relevante. (Olanrewaju et al., 2017).

Capítulo 2: Metodología

Recolección de muestra

Previo a la toma de muestra se realizó una entrevista con el dueño del predio en la zona de Nealtican, Puebla, como evidencia de uso de pesticidas (Anexo 1).

El muestreo de suelo se efectuó en el municipio de San Buenaventura Nealtican, Puebla, en un predio donde se lleva a cabo siembra de maíz y frijol con aplicación intensiva de pesticidas, con coordenadas: 19°03'32.7" N 98°25'40.1" W (Figura 3), y se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-AA-105-1988, Plaguicidas determinación de residuos en suelo – método de toma de muestras.

Figura 3. Zona de muestreo.



Fuente: Google Maps. (junio, 2019).

Las muestras de suelo limpio (suelo sin contaminación, reportada por los productores sin usos de plaguicidas, tomado en una parcela aledaña pendiente arriba) y de suelo contaminado se trasladaron al laboratorio de microbiología de suelos “Dr. Jesús Caballero Mellado” para su análisis.

Análisis de fisicoquímico del suelo

La caracterización del suelo limpio y contaminado se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Los parámetros determinados fueron: pH, conductividad eléctrica, densidad aparente, materia orgánica, nitrógeno total, textura, fósforo disponible y capacidad de intercambio catiónico.

Cuantificación de poblaciones microbianas, aislamiento e identificación de cepas

Cuantificación de la población microbiana

Se cuantificaron las poblaciones de bacterias, hongos y actinomicetos en las muestras de suelo limpio, suelo contaminado y suelo inducido con 1000 ppm de glifosato, se pesaron 10 g de suelo y se adicionaron a 90 ml de solución buffer de fosfatos y se llevó a agitación durante una hora, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-7} , cada una de las diluciones fueron sembradas por extendido en placa adicionando 100 μ l en medios sólidos de Cuenta Estándar (CE), Agar Papa Dextrosa (PDA), Rojo Congo (RC) y Rosa de Bengala (RB). Las placas de CE se incubaron por 24 horas, mientras que las placas de PDA, RC y RB se mantuvieron en incubación por 72 horas, a una temperatura 33°C. Cada extendido en placa se realizó por triplicado.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

De las colonias bacterianas aisladas se seleccionaron a aquellas presentes en ambas muestras de suelo, se realizó una resiembra por estría cruzada en placas de Agar Nutritivo (AN) hasta obtener cultivos axénicos con base en su morfología colonial.

Para la identificación de las cepas se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas, las cuales fueron: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Lisina Hierro (LIA), Agar Urea, Agar Citrato de Simmons, Agar MIO y Caldo MR-VP, incubadas a 32°C por 24 horas, con excepción de los caldos MR-VP que se incubaron por 48 horas. Asimismo, se emplearon galerías API® 20 NE

(Pruebas miniaturizadas bioMérieux para la Identificación de bacilos Gram-negativos no entéricos en 24-48 h de incubación) para la identificación bacteriana, se siguieron las instrucciones del fabricante. Posterior a los ensayos, las cepas que presentaron mayor crecimiento en caldos de cultivo utilizando glifosato fueron enviadas a Laboratorio Exakta para su identificación por el sistema de identificación MALDI TOF MS.

Concentración mínima inhibitoria (CMI) al glifosato de las cepas aisladas

La determinación de la CMI se hizo en tubo con medio líquido similar al descrito por Banat et al. (1991), con la siguiente composición (g/L): 1.3609 KH_2PO_4 , 1.7420 K_2HPO_4 , 1.0 glucosa, 1.0 NaCl, 0.1 extracto de levadura, 10 ml de las soluciones A [25MgSO_4], B [$100 (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] y C [0.5EDTA , 3.0MnSO_4 , 1NaCl , 0.1CaCl_2 , 0.1ZnSO_4 , 0.1FeSO_4 , 0.1CuSO_4 , $0.01 \text{Na}_2\text{MoO}_4$ y 0.01 ácido bórico]. Se probó el crecimiento de las cepas en presencia de glifosato en concentraciones de 0 hasta 16000 ppm. Para la preparación de las concentraciones de glifosato se usó la presentación comercial Rival que contiene 74.7% en peso del ingrediente activo. Los tubos fueron inoculados con 100 μl de las cepas aisladas previamente ajustadas a una densidad óptica de 0.3 empleando un espectrofotómetro marca Jenway modelo 6300 a 610 nm de longitud de onda, dejándose en agitación durante cinco días a 33°C . Se observó su crecimiento mediante la turbidez presente en los tubos y se midió su densidad óptica. Cada una de las mediciones se realizaron por triplicado.

Uso de glifosato como fuente de carbono y/o nitrógeno

Se evaluó la capacidad de las cepas más resistentes para emplear el glifosato como fuente de carbono y nitrógeno. Las cepas fueron sembradas en caldo Banat et al. (1991), omitiendo las fuentes de carbono y de nitrógeno, se agregó glifosato hasta llegar a una concentración de 4000 ppm. Se inocularon los tubos con 100 μl de suspensión de células de las cepas bacterianas, previamente lavadas con solución de buffer de fosfatos estéril y ajustadas a una densidad óptica de 0.3. Los tubos se incubaron con agitación de 200 RPM a 33°C durante

cinco días, pasado el tiempo de incubación se midió el crecimiento en los tubos. Cada una de las mediciones se realizaron por triplicado.

Producción de auxinas

Se evaluó la capacidad de producción de auxinas de las cepas aisladas utilizando un medio de cultivo específico con triptófano como precursor de índoles y se siguió la metodología descrita por Fuentes et al. (1993). Se adicionó un mililitro de cepa previamente ajustada a 0.3 de densidad óptica en matraces de 250 ml con 50 ml de medio de cultivo. Se llevaron a agitación a 33°C por 96 horas, después se centrifugaron a 5000 RPM a 4°C durante 15 minutos, se decantaron los sobrenadantes en recipientes de vidrio con tapa y se mantuvieron en refrigeración hasta su extracción. Para la extracción de los compuestos indólicos, los sobrenadantes se ajustaron con HCl al 10% a un pH de 2.5 y se les realizaron tres extracciones utilizando acetato de etilo en embudos de separación de 125 ml agitando manualmente en tres periodos de cinco minutos cada uno, se recuperó la parte orgánica, posteriormente se evaporó en un evaporador a 37°C hasta sequedad. Se agregó un mililitro de hexano grado HPLC para recuperar los índoles y se almacenaron en tubos Eppendorf protegidos de luz y en refrigeración.

La presencia de auxinas se determinó por cromatografía en capa fina, empleando cromatoplasmas de sílica gel y estándares de fitohormonas. Los estándares de fitohormonas utilizados fueron ácido indol-3-acético (IAA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido indol-3-propiónico (IPA) y ácido indol-3-láctico (ILA) (Merck-Sigma USA). La fase móvil empleada para el corrimiento fue benceno: acetato de etilo: ácido acético glacial (70:25:5), la cámara cromatográfica se saturó durante una hora. Se colocaron dos µl de estándares de hormonas y cinco µl de los extractos de las cepas en cromatoplasmas de sílica gel. Las cromatoplasmas se colocaron en la cámara cromatográfica y se dejó ascender la fase móvil hasta 0.5 cm del borde superior. Posteriormente las cromatoplasmas se dejaron secar en campana de extracción, se utilizó una lámpara de luz ultravioleta a 254 nm de longitud de onda para mostrar la presencia de las fitohormonas.

Inoculación de frijol con las cepas aisladas

Se evaluó la capacidad de las cepas aisladas para promover el crecimiento vegetal empleando semillas de frijol, primero se lavaron y desinfectaron. Las semillas fueron lavadas con agua destilada y desinfectadas con solución de cloro al 1% por cinco minutos, posteriormente lavadas cuatro veces con agua destilada estéril. Cultivos de 24 horas de las cepas a ensayar fueron ajustados a una densidad óptica de 0.3 (1×10^6 UFC/ml) y las semillas fueron sumergidas por 30 minutos. Las semillas se mantuvieron en cajas de plástico y se regaron con dos ml de los caldos ajustados. Se evaluó el porcentaje de pregerminación de las semillas a las 24 y 48 horas. Posteriormente se depositaron siete semillas germinadas en macetas que contenían 1.6 kilogramos de suelo contaminado con glifosato recolectado de la zona de estudio. Se evaluó el crecimiento radicular, crecimiento de la parte aérea, número de hojas y formación de nódulos a los 30 y 50 días posteriores a la siembra.

Capítulo 3: Resultados y discusión

Caracterización del suelo

Los resultados de la caracterización de los suelos limpio y contaminado se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. *Propiedades fisicoquímicas de suelo limpio y contaminado.*

Parámetro	Suelo limpio	Interpretación	Suelo contaminado	Interpretación
pH	6.40	Moderadamente ácido	5.45	Moderadamente ácido
Conductividad eléctrica (ds/cm)	0.228	Efectos despreciables de la salinidad	0.113	Efectos despreciables de la salinidad
Materia orgánica (%)	0.40	Muy bajo	0.23	Muy bajo
Fósforo (mg/l)	149.03	Alto	167.93	Alto
Nitrógeno total (%)	0.02	Muy bajo	0.01	Muy bajo
Densidad aparente (g/ml)	1.77	Arenosos	1.87	Arenosos
CIC (cmol(+)/kg)	0.8	Muy baja	1.2	Muy baja
Textura	Arena 88% Limo 8% Arcilla 4%	Arenoso	Arena 90% Limo 6% Arcilla 4%	Arenoso

En los parámetros determinados en los suelos se observa que algunos presentaron una disminución. En el suelo contaminado se puede observar una disminución en parámetros como: pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y nitrógeno total en comparación con el suelo limpio. Los cambios que se presentan en la muestra de suelo contaminado pueden ser atribuidos a las actividades agrícolas. Medina et al. (2006), reportaron cambios en las propiedades fisicoquímicas del suelo en cultivos de maíz en sistemas de temporal.

Haney et al. (2002) estudiaron 9 suelos diferentes, con variaciones en pH, carbono orgánico y contenido de arcilla, los resultados indican que estos parámetros no necesariamente indicaran qué tan rápido se mineralizará el glifosato en un suelo determinado.

Conteo de poblaciones microbianas

Tabla 3. Conteo de poblaciones microbianas presentes en las muestras del suelo.

Tratamiento	Medios de cultivo			
	CE	PDA	RB	RC
Suelo Limpio	8.78	8.14	6.99	5.12
Suelo Contaminado	8.63	8.13	7.23	7.60
Suelo Inducido	8.72	7.93	7.21	6.12

Poblaciones expresadas en log UFC/g de suelo. El valor representa la media de tres evaluaciones.

En la tabla 3 se muestran las poblaciones microbianas de los suelos, se observa que en caso de la población de bacterias mesofílicas cultivables se presenta una ligera disminución, sin embargo, en las poblaciones de actinomicetos existe un incremento tanto en el suelo contaminado como en el suelo inducido con glifosato. En algunos estudios se muestra que existe un impacto negativo en la biomasa del suelo alterando la fisiología y bioquímica de la microbiota, donde algunos grupos microbianos pueden utilizar a los pesticidas como fuente de nutrientes y energía mientras que para otros pueden ser tóxicos. (Hussain et al. 2009).

Adomako y Akyeampong (2016), utilizaron un suelo sin antecedentes de uso de herbicidas, el cual al ser inducido con glifosato a la mitad de la dosis recomendada por el fabricante mostró un incremento en la población bacteriana desde los 5 días iniciado el tratamiento, mientras que observaron una disminución en la población al aplicar dosis normales y al doble de lo recomendado por el fabricante después de 15 días de exposición al glifosato.

Locke et al. (2008), encontraron opiniones variadas acerca del efecto del glifosato en las poblaciones bacterianas, por ejemplo, a un mayor uso de glifosato se pueden alterar las poblaciones microbianas del suelo. Por otro lado, algunos investigadores han demostrado que la adición de glifosato al suelo no afectó significativamente las poblaciones, excepto cuando el suelo

se trató con concentraciones de glifosato excesivamente altas. Otros han observado que el glifosato aplicado en bajas concentraciones estimula las poblaciones microbianas y parámetros de actividad como enzimas, respiración y mineralización de nitrógeno.

Aislamiento e identificación de cepas bacterianas

De las poblaciones bacterianas se seleccionaron once cepas, de las cuales una dejó de presentar crecimiento. Las cepas aisladas fueron sembradas en agar nutritivo y se observó su morfología colonial con un estereoscopio marca Leica modelo EZ4. Las características coloniales, tinción de Gram y morfología microscópica se muestran en la tabla 4.

Todas las cepas presentaron morfologías macroscópicas diferentes, en cuanto a la morfología microscópica se observaron siete bacilos cortos gram negativo, dos bacilos cortos gram positivo y uno presenta una agrupación en cadena de bacilos gram positivo.

A las 10 cepas aisladas se les realizaron pruebas bioquímicas por triplicado, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Los resultados obtenidos al utilizar el sistema de identificación API® 20 NE en las cepas aisladas gram negativas se muestran en la tabla 6. Las 10 cepas fueron enviadas para su identificación por el sistema MALDI TOF MS, con el resultado de esta identificación se pudo confirmar el género de las bacterias más no su especie. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 4. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas.

Cepas bacterianas		
Clave de identificación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
GLI-3	Amarilla, forma puntiforme, plana, suave, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.
GLI-DI	Blanca, forma irregular, plana, seca, borde irregular.	Bacilos cortos, Gram positivos.
GLI-RA	Blanca, forma redonda, convexa, cremosa, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.
GLI-BI	Blanca, forma redonda, plana, suave, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.
GLI-2	Blanca, forma redonda, convexa, cremosa, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.
AG-1	Blanca, forma irregular, plana, seca, borde irregular.	Estreptobacilos, Gram positivos.
AG-2	Café, forma irregular, convexa, suave, borde irregular.	Bacilos cortos, Gram negativos.
SNC-A	Blanca, forma redonda, convexa, cremosa, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.
SNC-BA	Blanca, forma irregular, plana, seca, borde irregular.	Bacilos cortos, Gram positivos.
SNC-BB	Amarilla, forma redonda, plana, suave, borde entero.	Bacilos cortos, Gram negativos.

Tabla 5. Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas.

Pruebas bioquímicas									
Cepa	TSI	LIA	Citrato	Urea	MR	VP	M	I	O
GLI-3	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
GLI-DI	No fermenta, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	-	-	+	+	-	-	+
GLI-RA	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/K, sin gas, sin H ₂ S	+	+	-	-	-	-	-
GLI-BI	No fermenta, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	-	+	-	-	-	-	-
GLI-2	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/K, sin gas, sin H ₂ S	+	+	-	-	-	-	+
AG-1	No fermenta, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	-	+	-	-	-	-	+
AG-2	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/K, sin gas, sin H ₂ S	+	-	-	-	-	-	-
SNC-A	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	+	+	-	-	-	-	+
SNC-BA	No fermenta, sin gas, sin H ₂ S	K/A, sin gas, sin H ₂ S	-	-	-	+	-	-	+
SNC-BB	K/N, sin gas, sin H ₂ S	K/K, sin gas, sin H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-

Nota: M (movilidad), I (índoles), O (ornitina), K/N (peptona aerobia), K/A (fermentación de la glucosa), K/K (descarboxilación de la lisina), MR (rojo de metilo), VP (Voges Proskauer).

Tabla 6. Identificación bacteriana de las cepas aisladas por API® 20 NE.

Identificación API® 20 NE		
Cepa	Resultado	% ID
GLI-3	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	88.7
GLI-BI	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	95.8
SNC-A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.7
SNC-BB	<i>Burkholderia cepacia</i>	95.1
AG-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.7
GLI-RA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.9
GLI-2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99.9

Tabla 7. Identificación bacteriana de las cepas aisladas por sistema MALDI TOF MS.

Identificación MALDI TOF MS		
Cepa	Resultado	Valor del espectro
GLI-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.96
GLI-BI	<i>Pseudarthrobacter defluvii</i>	1.95
SNC-A	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1.91
SNC-BB	<i>Paenarthrobacter aurescens</i>	1.99
AG-2	<i>Pseudomonas corrugata</i>	1.96
GLI-RA	<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	1.91
GLI-2	<i>Pseudomonas jessenii</i>	1.91
AG-1	<i>Bacillus pumilus</i>	1.91
GLI-DI	<i>Bacillus safensis</i>	1.86
SNC-BA	<i>Bacillus pumilus</i>	1.91

De acuerdo con los resultados en las tablas 6 y 7 de ambas identificaciones las cepas AG-2, SNC-A, GLI-RA y GLI-2 muestran una concordancia con el género bacteriano *Pseudomonas*, las cepas GLI-3, SNC-BB y GLI-BI obtuvieron géneros bacterianos distintos en las identificaciones empleadas, finalmente las cepas AG-1, GLI-DI y SNC-BA fueron identificadas con el género bacteriano *Bacillus*.

Castrejón et al. (2021), encontraron que los microorganismos (bacterias y hongos) más utilizados para la degradación del glifosato se encuentran *Achromobacter spp.*, *Agrobacterium*

radiobacter, *Alcaligenes sp.*, *Arthrobacter spp.*, *Bacillus cereus*, *Ochrobactrum spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*. El género de bacterias que más frecuentemente se ha reportado en la biodegradación de glifosato es *Pseudomonas spp.*, que lo utiliza como fuente de fósforo. Recientemente se documentó que el empleo de consorcios de *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* es una estrategia eficaz para degradar el glifosato en suelos ya que estas bacterias lo utilizan como única fuente de fósforo. En el presente trabajo encontramos que las cepas con mayor actividad en la utilización del glifosato pertenecen a estos 2 géneros.

Evaluación concentración mínima inhibitoria

Se realizó un primer ensayo para observar el comportamiento de las cepas en presencia de glifosato a bajas concentraciones, la evaluación cualitativa del crecimiento de las cepas se efectuó por observación de la turbidez presente en los tubos.

En un segundo ensayo se emplearon concentraciones de glifosato de 800 a 4000 ppm, el crecimiento de las cepas fue evaluado después de cinco días de incubación determinando la densidad óptica de los cultivos, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Densidad óptica de las cepas aisladas en baja concentración de glifosato.

Cepa	Densidad óptica						
	0 ppm	800 ppm	1000 ppm	1200 ppm	1500 ppm	2000 ppm	4000 ppm
SNC-BA	0.143	0.127	0.133	0.127	0.140	0.150	ND
AG-1	0	0.370	N/A	N/A	N/A	N/A	ND
AG-2	0.183	0.120	0.160	0.150	0.163	0.173	ND
SNC-BB	0.273	0.430	0.433	0.373	0.22	N/A	ND
SNC-A	0.260	0.210	0.233	0.233	0.223	0.200	ND
GLI-2	0.303	0.210	0.187	0.203	0.177	0.173	0.213
GLI-BI	0.267	0.210	0.210	0.183	0.197	0.177	0.180
GLI-RA	0.147	0.373	0.270	0.267	0.170	0.260	0.343
GLI-3	0.130	0.267	0.200	0.343	0.197	0.320	0.257
GLI-DI	0.093	0.180	0.100	0.175	0.120	0.113	0.170

Nota: los resultados obtenidos son el promedio de tres repeticiones, N/A (crecimiento de agregados en el medio) y ND (no se determinó).

En la tabla 8 se puede observar que la totalidad de las cepas no presentan inhibición a concentraciones de glifosato probadas, ya que al evaluar la densidad óptica de los cultivos estos mostraban ligeras variaciones en la DO respecto al control sin herbicida. En el caso de las cepas GLI-RA y GLI-3 mostraron un incremento de densidad óptica en todas las concentraciones evaluadas superando al control que no contenía glifosato.

Se seleccionaron cuatro cepas que mostraron poca variación en la densidad óptica estas cepas fueron: las cepas SNC-BB, SNC-A, GLI-2 y GLI-RA, las dos primeras aisladas de suelo no contaminado y las otras dos de suelo contaminado. Las cepas fueron sembradas en concentraciones de glifosato hasta las 16000 ppm. Las mediciones se realizaron al término de 5 días de incubación, los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Densidad óptica de las cepas aisladas con mejor tolerancia a altas concentraciones de glifosato.

Cepa	0 ppm	Densidad óptica*						
		1000 ppm	1200 ppm	1500 ppm	2000 ppm	4000 ppm	8000 ppm	16000 ppm
AG-1	0.163	0.087	0.09	0.113	0.070	0.107	0.073	0.077
SNC-BB	0.357	0.133	0.110	0.160	0.160	0.133	0.047	0.045
SNC-A	0.167	0.163	0.157	0.097	0.127	0.100	0.057	0.050
GLI-2	0.193	0.137	0.143	0.167	0.153	0.100	0.060	0.041
GLI-RA	0.183	0.110	0.157	0.110	0.120	0.093	0.077	0.070

*Los resultados obtenidos son el promedio de tres repeticiones.

En la tabla 9 se muestran las DO alcanzadas por las cinco cepas probadas, se puede observar que hay una disminución en las DO en concentraciones de 8000 y 16000 ppm de glifosato, lo que sugiere una inhibición provocada por la presencia de glifosato en las poblaciones microbianas.

Xu et al. (2019), encontraron que una cepa de *Providencia rettgeri* no presentaba inhibición ante la presencia de glifosato en concentraciones de 5000 y 10000 ppm. Por otra parte, Clair et al. (2012), estudiaron el efecto inhibitorio del glifosato a concentraciones menores a las recomendadas para la agricultura (10 000 ppm), en cepas de los géneros *Geotrichum candidum*,

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Encontraron que *G. candidum* y *L. cremoris* fueron más sensibles a concentraciones de 10 ppm y 100 ppm respectivamente. En el caso de *L. bulgaricus* las colonias disminuyeron su tamaño dependiendo la concentración a la que fue sometida.

Bote et al. (2019), evaluaron el efecto inhibitorio de una formulación comercial que contenía glifosato y glifosato en estado puro, empleando cepas de *E. coli*. En la mayoría de las cepas utilizadas la dosis mínima inhibitoria en el caso de glifosato puro fue de 10 ppm mientras que en el producto comercial fue de 40 ppm. Los aditivos y los tensoactivos en las formulaciones varían y los fabricantes no están obligados a declararlos públicamente. Se ha demostrado que estos complementos en las formulaciones de herbicidas pueden ser más tóxicos que el propio ingrediente activo. Esto sugiere que no solo la actividad del glifosato, sino también los diferentes ingredientes en una formulación interactúan con las bacterias e influyen en la concentración mínima inhibitoria.

Uso de glifosato como fuente de carbono y/o nitrógeno

Las cepas aisladas que presentaron tolerancia a las concentraciones más altas de glifosato del ensayo anterior (4000 ppm), se emplearon para evaluar la capacidad de los microorganismos de utilizar al glifosato como su fuente de carbono y/o de nitrógeno. Obteniéndose un resultado positivo en el uso de glifosato como fuente de nitrógeno, se midió la densidad óptica cada 24 horas durante cinco días y se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas de manera individual y en consorcios microbianos. Los resultados de las densidades ópticas se encuentran en la tabla 10.

En el caso de la cepa SNC-BB, está no mostró crecimiento en el medio sin nitrógeno al no observarse turbidez en ninguna repetición. Se observa que a las 24 horas de crecimiento las cepas individuales presentan menor crecimiento en comparación con los consorcios microbianos. En ambos casos después de las 48 horas de crecimiento la densidad óptica comenzó a disminuir,

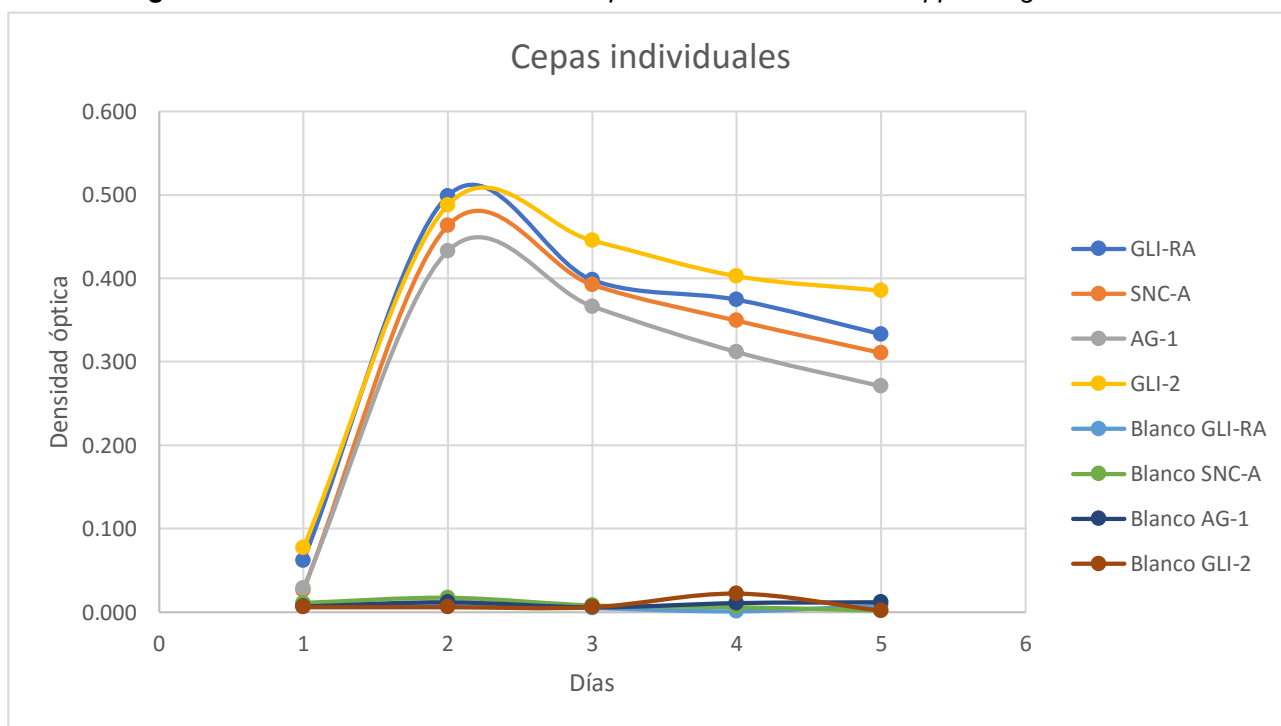
como en una curva de crecimiento que entraría en una fase estacionaria o de muerte. (Maier & Pepper, 2015).

Tabla 10. Densidad óptica de las cepas aisladas en medio sin nitrógeno con 4000 ppm de glifosato.

Cepa	Densidad óptica*				
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
GLI-RA	0.062	0.499	0.398	0.374	0.333
SNC-A	0.026	0.463	0.392	0.349	0.311
AG-1	0.029	0.432	0.366	0.312	0.271
GLI-2	0.077	0.488	0.445	0.403	0.385
SNC-A + GLI-2	0.356	0.389	0.336	0.309	0.283
GLI-2 + GLI-RA + SNC-A	0.370	0.432	0.395	0.364	0.329
SNC-A + GLI-RA	0.206	0.409	0.354	0.324	0.302
GLI-2 + GLI-RA	0.264	0.404	0.360	0.325	0.306

*Los resultados obtenidos son el promedio de tres repeticiones.

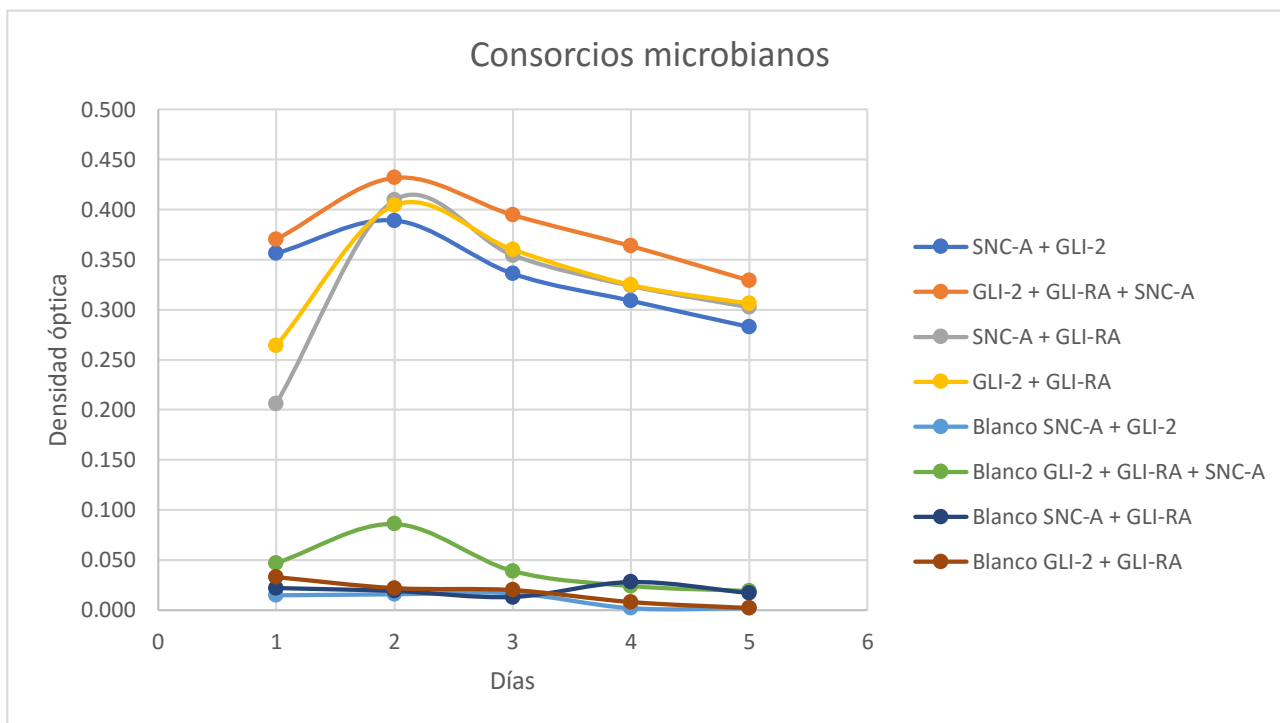
Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas individuales con 4000 ppm de glifosato.



Sviridov et al. (2015) menciona que existen varios géneros de bacterias, que utilizan el glifosato como fuente de fósforo, lo que implica que poseen enzimas que rompen el enlace C-P, las cepas que utilizan al glifosato como fuente de nitrógeno son menos abundantes, algunos de

los géneros que se ha encontrado que lo pueden hacer se encuentran: *Arthrobacter sp.*, mientras que, *Streptomyces sp.* y *Achromobacter sp.* usan al glifosato como fuente de carbono.

Figura 5. Curva de crecimiento de los consorcios microbianos con 4000 ppm de glifosato.



Se han encontrado dos formas de digestión enzimática de glifosato en bacterias: ruptura directa del enlace C-P, que produce sarcosina y fósforo inorgánico, y ruptura del enlace C-N, que produce glioxilato y AMPA.

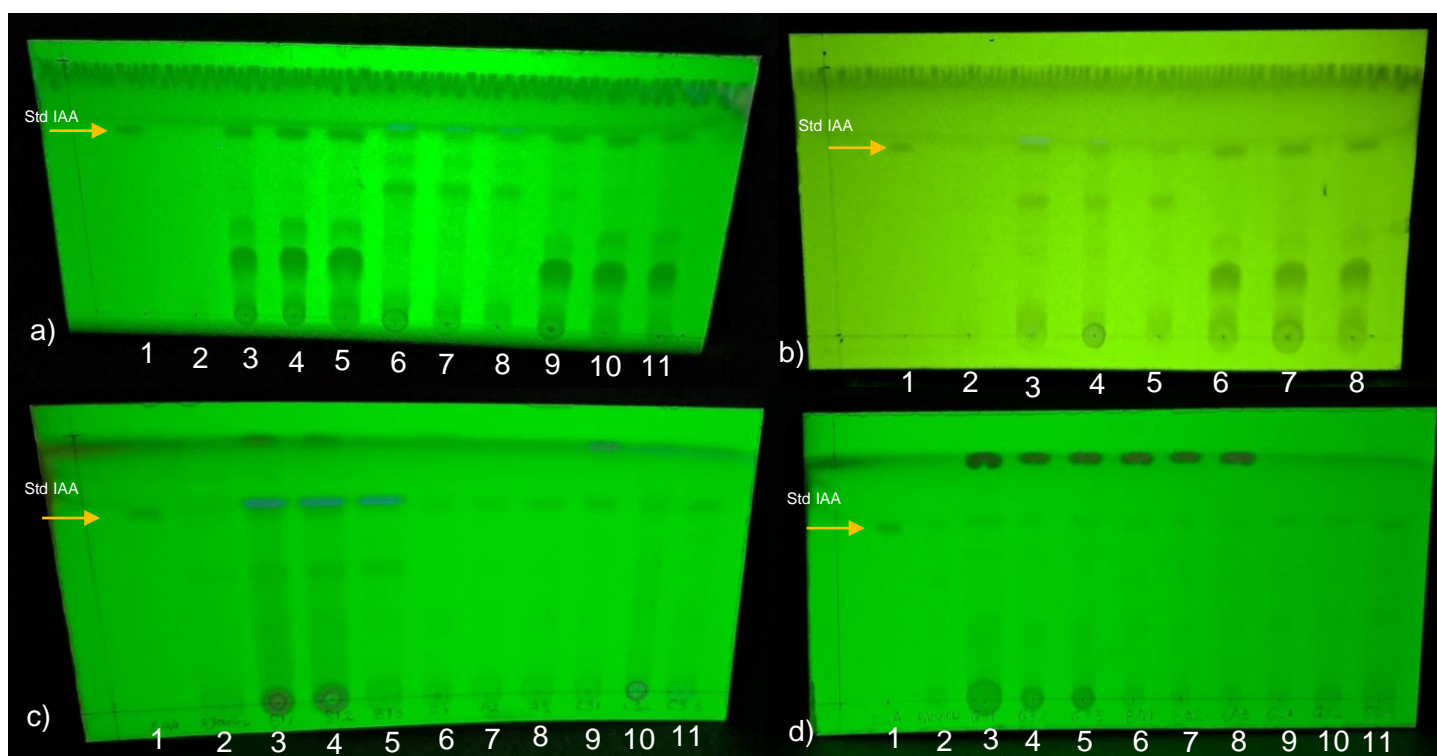
Mohanty y Das (2022), mencionan que algunas bacterias pueden utilizar el glifosato tanto como única fuente de carbono y de nitrógeno, así como de fósforo o como una mezcla de todos. Encontraron que microorganismos como *Ochrobactrum intermedium*, *Agrobacterium radiobacter* y *Achromobacter sp.* utilizan glifosato como única fuente de nitrógeno o carbono. También señalaron que en varios estudios se ha informado de la capacidad de los microorganismos para utilizar el glifosato principalmente como fuente de fósforo y algunos otros estudios lo informaron como la única fuente de carbono y nitrógeno.

Capacidad en la producción de auxinas

Se evaluó la capacidad de producción de auxinas de las cepas aisladas utilizando triptófano como precursor de indoles.

Todas las cepas ensayadas presentaron producción de ácido indol acético (IAA), además de la presencia de otros indoles. En la figura 6 se muestran las cromatografías en capa fina de los extractos de los cultivos de las cepas ensayadas. El carril 1 corresponde a el estándar de IAA, el carril 2 al medio de cultivo sin inocular y en los carriles del 3 al 11 se encuentran los triplicados de las cepas aisladas, la cepa C3 se usó como cepa control productora de auxinas, (la cepa C3 es parte de la colección del Laboratorio de Microbiología del Suelo “Dr. Jesús Caballero Mellado”). Se observó la presencia de IAA en todas las cepas al corresponder con el frente de corrimiento del estándar.

Figura 6. Cromatografías en capa fina para la detección de auxinas.



a) corresponde a los compuestos indólicos producidos por las cepas GLI-RA, AG-2 y GLI-DI, b) compuestos indólicos producidos por las cepas AG-1 y SNC-BB, c) compuestos indólicos producidos por las cepas GLI-BI, SNC-A y C3, y por último d) compuestos indólicos producidos por las cepas GLI-3, SNC-BA y GLI-2.

Jha y Saraf (2015), documentaron la capacidad de diversas especies bacterianas para producir auxinas como parte de su metabolismo, incluido el ácido indol-3-acético (IAA) y el ácido indol-3-butírico (IBA). Más del 80% de las bacterias rizosféricas son capaces de producir auxinas. Las auxinas liberadas por las rizobacterias ayudan al sistema radicular, aumentando su tamaño y peso, el número de ramificaciones, mejorando así la nutrición y la capacidad de crecimiento de las plantas. Otro resultado importante de la inoculación con bacterias productoras de auxinas es la formación de raíces adventicias. Todos los efectos anteriores pueden variar considerablemente dependiendo de la concentración de auxina que llegue al sistema radicular, incluso un exceso que podría ser inhibitorio.

Ahmed y Hasnain (2014), encontraron que la mayoría de las bacterias rizosféricas pueden producir IAA. Esto incluye bacterias patógenas como *Erwinia herbicola*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* y *Pseudomonas syringae* y bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Azotobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Azospirillum sp.*, *Rhizobium sp.*, *Bacillus sp.* y *Enterobacter sp.* Además de que la biosíntesis de IAA no es vital para el crecimiento bacteriano.

Inoculación de semillas de frijol

El porcentaje de germinación se evaluó a las 24 y 48 h y los resultados se muestran en la tabla 11.

Las cepas SNC-BA, SNC-BB, GLI-BI, GLI-RA y GLI-DI obtuvieron un porcentaje mayor de germinación en comparación con el blanco a las 48 horas de germinación. Las cepas GLI-2, GLI-3, AG-2, C3 y SNC-A se mantuvieron entre un 10%-50% de germinación siendo estos los porcentajes más bajos.

Tabla 11. Porcentaje de germinación en semillas de frijol inoculadas con las cepas aisladas.

Cepa	Porcentaje de germinación			
	Semillas germinadas 24h	Porcentaje	Semillas germinadas 48h	Porcentaje
Blanco	23	46%	40	80%
GLI-2	14	28%	22	44%
SNC-BA	39	78%	43	86%
AG-1	38	76%	39	78%
GLI-3	20	40%	27	54%
AG-2	4	8%	5	10%
SNC-BB	39	78%	42	84%
GLI-BI	41	82%	44	88%
GLI-RA	38	76%	41	82%
GLI-DI	38	76%	42	84%
C3	20	40%	25	50%
SNC-A	8	16%	12	24%

Las semillas germinadas se colocaron en macetas con suelo contaminado con glifosato de la zona de estudio. Las macetas estuvieron en condiciones de invernadero con riego cada tercer día. Se evaluó el porcentaje de brotación de las semillas. Esta prueba fue realizada por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 12.

El 50% de las plántulas comenzaron a brotar al sexto día, el brote de las plántulas se evaluó hasta el doceavo día. Los tratamientos que presentaron menor porcentaje de brotación que el control de suelo limpio fueron los tratamientos: control suelo contaminado, AG-2 y SNC-A con el 71.43%, 23.8% y 47.62% respectivamente, en todos los demás tratamientos el porcentaje de brotación fue mayor siendo las cepas GLI-BI y SNC-BA las que presentaron el 100% en brotación.

Tabla 12. *Porcentaje de brotación en semillas de frijol inoculadas en suelo con glifosato.*

Cepa	Porcentaje de brotación			
	6 días	7 días	10 días	12 días
Blanco SL	52.38%	61.90%	80.95%	85.71%
Control SC	14.29%	19.05%	71.43%	71.43%
GLI-2	33.33%	52.38%	80.95%	85.71%
AG-2	4.76%	19.05%	23.81%	23.81%
GLI-RA	71.43%	80.95%	85.71%	85.71%
GLI-BI	85.71%	100%	100%	100%
SNC-BA	76.19%	95.24%	100%	100%
SNC-BB	57.14%	71.43%	80.95%	85.71%
SNC-A	23.81%	28.57%	47.62%	47.62%
AG-1	47.62%	80.95%	90.48%	90.48%
GLI-DI	52.38%	61.90%	76.19%	85.71%
GLI-3	66.67%	85.71%	95.24%	95.24%
C3	42.86%	61.90%	80.95%	80.95%

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 30 y 50 días. Para evaluar el efecto de la inoculación de las cepas sobre las plantas de frijol, se determinó la longitud de raíces, parte aérea, número de hojas, número de nódulos y pesos secos de raíz y tallo, para evaluar el efecto de promoción vegetal por parte de las cepas. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 13 y 14.

Bashan et al. (2017), demostraron que la determinación del peso seco es una medida precisa para evaluar el crecimiento de plantas inoculadas con cepas promotoras del crecimiento vegetal. Por el contrario, el peso fresco es menos preciso porque se ve afectado por numerosos parámetros ambientales y técnicos, incluida la humedad relativa, la temperatura del laboratorio, las corrientes de aire antes de pesar cada muestra, la técnica utilizada para secar el exceso de humedad en las raíces.

El tratamiento de la cepa GLI-3 presentó incrementos respecto de las plantas en suelo limpio, en el peso seco de raíz, peso seco parte aérea y longitud de raíz, los demás tratamientos

presentaron respuestas variables. Sin embargo, en los tratamientos con las cepas bacterianas en suelo contaminado, salvo SNC-A, presentaron incrementos en los diferentes parámetros evaluados respecto a las plantas sembradas en suelo contaminado sin inocular, lo que sugiere que la inoculación de las cepas confiere cierta protección a la planta contra el glifosato, en ningún caso la nodulación de las plantas en suelo contaminado fue mayor que la que se tuvo en plantas en suelo limpio.

Al término de los 50 días se observó que todas las cepas bacterianas presentaron un incremento en todos los parámetros evaluados en comparación con el control del suelo contaminado, todas las cepas con excepción de GLI-2 y GLI-BI presentaron un incremento en la longitud de la raíz respecto al blanco de suelo limpio.

Tabla 13. Evaluación del crecimiento vegetal en plántulas de frijol inoculadas a los 30 días.

Crecimiento a los 30 días						
Cepa	Peso seco raíz (g)	Peso seco tallo (g)	Longitud raíz (cm)	Longitud tallo (cm)	Número de nódulos	Número de hojas
Blanco SL	0.35	0.45	22.91	26.16	73	8
Control SC	0.29	0.37	18.48	20.43	22	8
GLI-2	0.32	0.48	22.13	24.36	35	8
AG-2	0.43	0.45	23.65	22.25	25	8
GLI-RA	0.33	0.44	26.03	22.31	47	8
GLI-BI	0.42	0.41	24.58	23.99	47	8
SNC-BA	0.39	0.38	22.29	21.17	27	7
SNC-BB	0.29	0.35	20.12	21.61	12	7
SNC-A	0.27	0.35	21.37	19.31	12	7
AG-1	0.39	0.32	24.58	22.36	21	7
GLI-DI	0.38	0.41	23.24	22.37	20	6
GLI-3	0.71	0.50	27.70	25.37	30	8
C3	0.45	0.35	25.20	21.81	32	8

Los datos obtenidos son el promedio de tres repeticiones.

Tabla 14. Evaluación del crecimiento vegetal en plántulas de frijol inoculadas a los 50 días.

Crecimiento a los 50 días						
Cepa	Peso seco raíz	Peso seco tallo	Longitud raíz	Longitud tallo	Número de nódulos	Número de hojas
Blanco SL	2.25	0.63	19.43	25.83	18	17
Control SC	0.55	0.25	15.58	18.24	6	10
GLI-2	1.09	0.40	19.11	21.34	12	11
AG-2	1.13	0.51	21.57	22.80	9	11
GLI-RA	1.34	0.47	25.19	23.44	16	10
GLI-BI	1.05	0.39	17.40	21.97	8	8
SNC-BA	1.12	0.40	19.91	20.69	7	10
SNC-BB	1.40	0.47	20.46	22.09	9	11
SNC-A	0.60	0.41	22.11	19.37	7	11
AG-1	1.36	0.40	25.71	22.97	8	11
GLI-DI	0.88	0.32	20.41	20.96	10	10
GLI-3	0.88	0.39	21.51	22.28	9	9
C3	0.88	0.29	20.58	19.47	10	9

Los datos obtenidos son el promedio de tres repeticiones.

Travaglia et al. (2015), observaron la acción estimulante de bacterias como *Azospirillum sp.* y *Pseudomonas sp.* sobre el sistema radicular del maíz tras la inoculación, los principales efectos fueron raíces más largas y crecimiento de pelos radicales. Ambas bacterias mejoraron el crecimiento y desarrollo temprano del maíz en presencia de glifosato. La aplicación de cualquiera de estas bacterias aumentó el contenido de fitohormonas de la planta en presencia de glifosato. El aumento en el contenido de ácido jasmónico en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas indicó que podría haber una mejor respuesta ante la presencia del glifosato debido a que esta fitohormona modula las respuestas al estrés y al desarrollo.

Efecto del glifosato a diferentes concentraciones en semillas de frijol inoculadas

En este ensayo se seleccionaron las cepas GLI-BI, GLI-RA y SNC-BA para evaluar la protección que proporcionaban a las semillas de frijol al someterlas a diferentes concentraciones

de glifosato, las concentraciones probadas fueron 1000, 2500, 5000, 7500 y 10000 ppm respectivamente.

En las figuras 7 y 8, A) corresponde a la cepa SNC-BA, B) a la cepa GLI-BI y C) a la cepa GLI-RA, en ambas figuras se puede observar el incremento tanto en la parte radical como en la parte aérea en la concentración de 1000 ppm en comparación con el blanco. Las tres cepas usadas en concentraciones de 2500 y 5000 ppm permitieron la germinación y brotación de las semillas, pero mostrando poco desarrollo. En las concentraciones de 7500 y 10000 ppm ninguna de las semillas utilizadas logró germinar.

Figura 7. Zona radical de plántulas de frijol inoculadas en diferentes concentraciones de glifosato

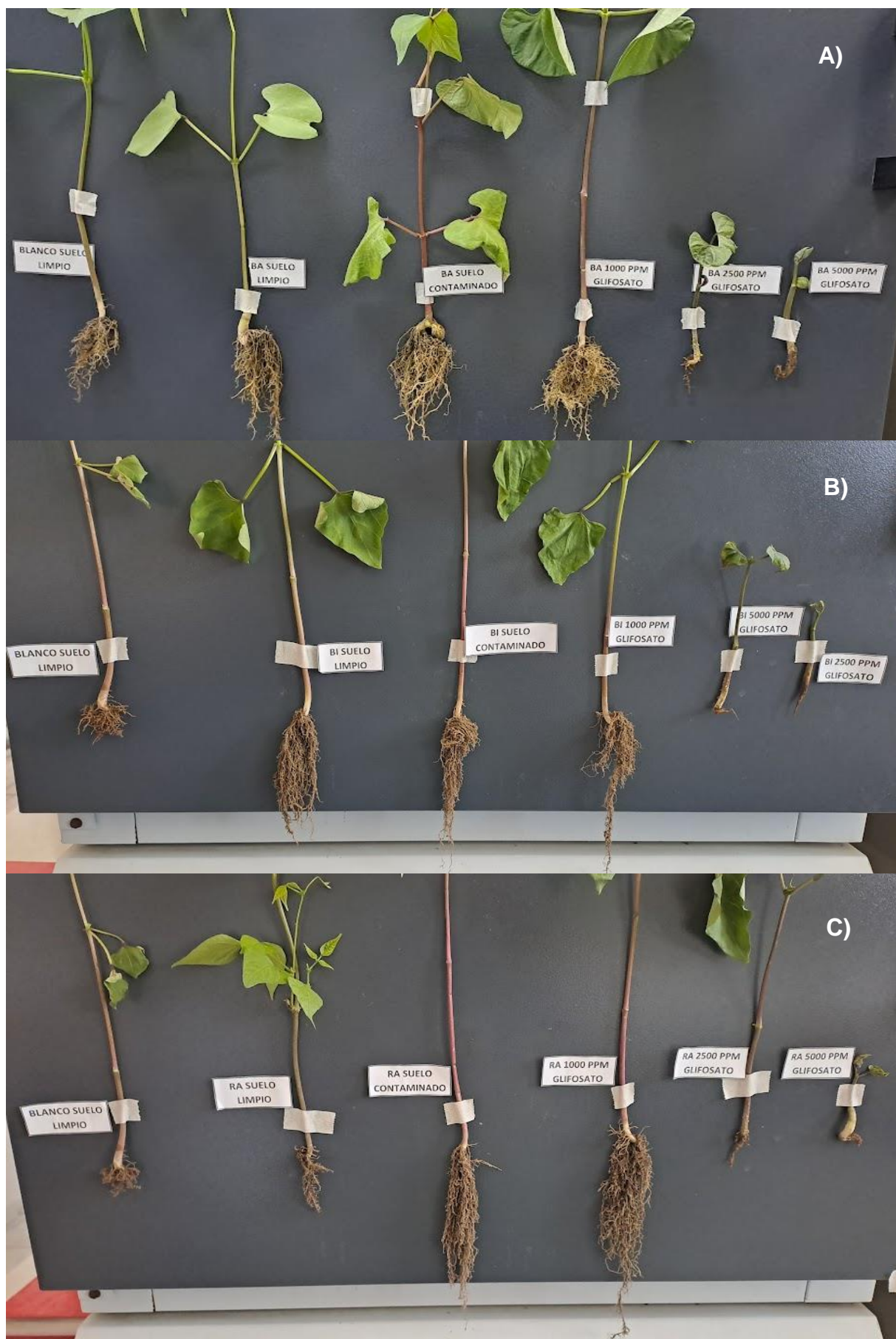


Figura 8. Parte aérea de plántulas de frijol inoculadas a diferentes concentraciones de glifosato.



El término hormesis describe un fenómeno dosis-respuesta en donde la aplicación de bajas dosis de herbicidas estimula el crecimiento mientras que altas dosis inducen la inhibición. Jalal et al. (2021), explican que la aplicación de herbicidas (2,4-D, glifosato, paraquat) en bajas concentraciones regula el crecimiento de las plantas mediante la producción de auxinas. El glifosato aplicado en dosis recomendadas puede inhibir la síntesis de aminoácidos aromáticos y la fotosíntesis provocando la muerte de la planta. Por otro lado, en dosis muy bajas puede estimular el crecimiento de las plantas, acortar el ciclo de vida de las plantas y mejorar la productividad.

Varios investigadores han registrado el efecto estimulante en diversas especies vegetales, como: *Hordeum vulgare* (cebada), *Zea mays* (maíz), *Glycine max* (soja), *Eucalyptus grandis* (eucalipto), *Pinus caribea* (pino), *Saccharum spp.* (caña de azúcar), *Coffea arabica* L. (café) y *Lactuca sativa* (lechuga); en las primeras etapas de desarrollo al promover la altura de la planta, crecimiento de la raíz, aumento en la biomasa y la aparición de brotes. (Pincelli et al. 2020, Ather et al. 2016).

Conclusiones

Las cepas bacterianas gram negativas aisladas se identificaron dentro de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Brevundimonas sp.*, *Burkholderia sp.*, *Sphingomonas sp.*, pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, las cepas bacterianas gram positivas se identificaron con el género *Bacillus sp.*

Las poblaciones bacterianas del suelo no se ven alteradas al inducir con 1000 ppm de glifosato.

Siete de las diez cepas aisladas toleraron hasta 4000 ppm de glifosato, mientras que tres cepas toleraron hasta 2000 ppm de glifosato, ninguna de las cepas toleró una concentración mayor a 8000 ppm.

Las cepas GLI-RA, SNC-A, AG-1 y GLI-2 tienen la capacidad de utilizar el glifosato como fuente de nitrógeno, además de que las mismas cepas no utilizaron el glifosato fuente de carbono.

El total de las cepas aisladas produjeron auxinas, en específico ácido indol-3-acético al presentar el mismo frente de corrimiento del estándar y una cepa control.

La cepa GLI-3 destacó entre todas las cepas al mostrar un efecto positivo al inocularse en las semillas de frijol, aumentando los pesos secos y las longitudes aérea y radical.

Bibliografía

- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., & Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28-39. doi: 10.12691/ijebb-3-1-5
- Adomako, M. O., & Akyeampong, S. (2016). Effect of some commonly used herbicides on soil microbial population. *Journal of Environment and Earth Science*, 6(1), 30-38.
- Agudelo, L. M., Macias, K. I., y Suárez, A. J. (2005). Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista de Investigación* 2(1), 57-60.
- Ahmed, A., & Hasnain, S. (2014). Auxins as One of the Factors of Plant Growth Improvement by Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 63(3), 261-266.
- Akashe, M. M., Pawade, U. V., & Nikam, A. V. (2018). Classification of pesticides: a review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 9(4), 144-150. doi: 10.7897/2277-4343.094131
- Alcántara, R., Cruz, H. E., Domínguez, J. A., y De Prado, R. (2021). Glyphosate ban in Mexico: potential impacts on agriculture and weed management. *Pest Management Science*, 77(9), 1-12. doi: 10.1002/ps.6362
- Alori, E. T. (2015). Phytoremediation using microbial communities: II. In A. A. Ansari, S. S. Gill, R. Gill, G. R. Lanza, & L. Newman (Eds.), *Management of Environmental Contaminants* (Vol. 2, pp. 183-190). Springer.
- Ather, M., Abbas, T., Tanveer, A., Maqbool, R., Zohaib, A., & Shehzad, M. A. (2016). Glyphosate hormesis in broad-leaved weeds: a challenge for weed management. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(3), 344–351. doi: 10.1080/03650340.2016.1207243
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11). doi: 10.1007/s11274-016-2137-x

- Banat, I. M., Samarah, N., Murad, M., Horne, R., & Banerjee, S. (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 80-88.
- Bashan, Y., Huang, P., Kloepper, J. W., & de Bashan, L. (2017). A proposal for avoiding fresh-weight measurements when reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo)bacteria on growth promotion of plants. *Biology and Fertility of Soils*, 53(1), 1-2. doi:10.1007/s00374-016-1153-1
- Beckie, H. J., Flower, K. C., & Ashworth, M. B. (2020). Farming without Glyphosate? *Plants*, 9(1), 1-15. doi: 10.3390/plants9010096
- Borggaard, O. K., & Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64(4), 441-456. doi: 10.1002/ps.1512
- Bote, K., Pöppe, J., Merle, R., Makarova, O., & Roesler, U. (2019). Minimum inhibitory concentration on glyphosate and of a glyphosate-containing herbicide formulation for *Escherichia coli* isolates – differences between pathogenic and non-pathogenic isolates and between host species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00932
- Brenbook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(3), 1-15. doi: 10.1186/s12302-016-0070-0
- Burbano, H. (2016). El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. *Revista de ciencias agrícolas*, 33(2), 117-124. doi: 10.22267/rcia.163302.58
- Castrejón, M. L., Tovar, E., Valencia, L., Rosas, M. E., Rodríguez, A., y Mussali, P. (2021). Glyphosate pollution treatment and microbial degradation alternatives, a review. *Microorganisms* 9(11), 1-21. doi: 10.3390/microorganisms9112322
- Cerdeira, A. L., & Duke, S. O. (2006). The Current Status and Environmental Impacts of Glyphosate-Resistant Crops. *Journal of Environment Quality*, 35(5), 1633-1658. doi: 10.2134/jeq2005.0378

- Clair, E., Linn, L., Travert, C., Amiel, C., Séralini, G. E., & Panoff, J. M. (2012). Effects of Roundup® and Glyphosate on three food microorganisms: *Geotrichum candidum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Current Microbiology*, *64*, 486-491. doi: 10.1007/s00284-012-0098-3
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2020). *Expediente científico sobre el glifosato y los cultivos GM*.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2022). *Conacyt recomendó a las autoridades competentes las cotas de importación de glifosato para 2022 en atención a Decreto presidencial*.
- Dhananjayan, V., Jayakumar, S., & Ravichandran, B. (2019). Conventional Methods of Pesticide Application in Agricultural Field and Fate of the Pesticides in the Environment and Human Health. In K. R. R., S. Thomas, T. Volova & J. K. (Eds.), *Controlled Release of Pesticides for Sustainable Agriculture*, 1–39. doi: 10.1007/978-3-030-23396-9_1
- Ermakova, I. T., Kiseleva, N. I., Shushkova, T., Zharikov, M., Zharikov, G. A., & Leontievsky, A. A. (2010). Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *88*(2), 585–594. doi: 10.1007/s00253-010-2775-0
- Etim, E. E. (2012). Phytoremediation and Its Mechanisms: A Review. *International Journal of Environment and Bioenergy*, *2*(3), 127-136.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del sistema sanitario de Navarra*, *26*, 155-171
- Fuentes, L. E., Jiménez, T., Abarca, I. R., & Caballero, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and soil*, *154*, 145-150.
- García, Y., Ramírez, W., y Sánchez, S. (2012). Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y Forrajes*, *35*(2). 125-138.

- Gatto, M. P., Cabella, R., & Gherardi, M. (2016). Climate change: the potential impact on occupational exposure to pesticides. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*, 52(3), 374-385. doi: 10.4415/ANN_16_03_09
- Gavrilescu, M. (2005). Fate of pesticides in the Environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497-526. doi: 10.1002/elsc.200520098
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*, 12, 1-16.
- Grijalbo, L., Fernández, M., Gutiérrez, F. J., y Lucas J. A. (2015). Phytoremediation of Contaminated Waters to Improve Water Quality. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 2, 11-23. doi: 10.1007/978-3-319-10969-5_2
- Haney, R. L., Senseman, S. A., & Hons, F. M. (2002), Effect of Roundup Ultra on microbial activity and biomass from selected soils. *Journal of Environment Quality*, 31(3), 730-735. doi: 10.2134/jeq2002.7300
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009). Chapter 5 Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Advances in Agronomy*, 102, 159-200. doi: 10.1016/S0065-2113(09)01005-0
- Jalal, A., Oliveira, J. C., Ribeiro, J. S., Fernandes, G. C., Mariano, G. G., Trindade, V. D. R., & Reis, A. R. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 1-12. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111225
- Jha, C. K., & Saraf, M. (2015). Plant growth promoting Rhizobacteria (PGRP): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*, 5(2), 108-119.
- Locke, M. A., Zablotowicz, R. M., & Reddy, K. N. (2008). Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. *Pest Management Science*, 64(4), 457-469. doi: 10.1002/ps.1549
- Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2015). Bacterial Growth. *Environmental Microbiology*, 37–56. doi:10.1016/b978-0-12-394626-3.00003-x

- Matzafri, M. (2018). Climate change exacerbates pest damage through reduced pesticide efficacy. *Pest Management Science*. doi: 10.1002/ps.5121
- McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2005). Basic soil Properties. *Soil & water management*. 1-12.
- Medina, J., Volke, V. H., González, J., Galvis, A., Santiago, M. J. y Cortés, J. L. (2006). Cambios en las propiedades físicas del suelo a través del tiempo en los sistemas de maíz bajo temporal y mango bajo riego en luvisoles del estado de Campeche. *Universidad y Ciencia*, 22(2), 175-189.
- Meftaul, I. M., Venkateswarlu, K., Dharmarajan, R., Annamalai, P., Asaduzzaman, M., Parven, A., & Megharaj, M. (2020). Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? *Environmental Pollution*, 263, 1-18. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114372
- Mohanty, S. S., & Das, A. P. (2022). A systematic study on the microbial degradation of glyphosate: A review. *Geomicrobiology Journal*, 39(3-5), 316-327. doi: 10.1080/01490451.2021.1998255
- Murphy, B. W. (2015). Impact of soil organic matter on soil properties – a review whit emphasis on Australian soils. *Soil Research*, 56(6), 605-635. doi: 10.1071/sr14246
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(11), 1-16. doi: 10.1007/s11274-017-2364-9
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1990). *Capítulo 1: Introducción*.
- Peralta, M. R., y Volke, T. L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 75-88.

- Pincelli, R. P., Bortolheiro, F. P., Carbonari, C. A., Velini, E. D., & Silva, M. A. (2020). Hormetic effect of glyphosate persists during the entire growth period and increases sugarcane yield. *Pest Management Science*, *76*(7), 2388–2394. doi: 10.1002/ps.5775
- Polanco, A. G., Magaña, T. V., Cetz, J., y Quintal, R. (2019). Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán, México. *Centro agrícola*, *46*(2), 72-83.
- Prasad, S., Srivastava, S., Singh, M., & Shukla, Y. (2009). Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. *Journal of Toxicology*, 1–6. doi: 10.1155/2009/308985
- Qasem, J. R. (2011). Herbicides Applications: Problems and considerations. In A. Kortekamp (Ed.), *Herbicides and Environment* (pp. 643-664). InTech.
- Richmond, M. E. (2018). Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*. 1-19. doi: 10.1007/s13412-018-0517-2
- Rives, N., Acebo, Y., y Hernández, A. (2007). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de arroz (*Oryza sativa L.*). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos tropicales*, *28*(2). 29-38.
- Rosales, E., y Esqueda, V. (2006). Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. 1-16.
- Salazar, N. J., y Aldana, M. L. (2011). Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *Revista Biotecnia*, *13*(2), 23-28.
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P. K., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Singh, D., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(20), 1-18. doi: 10.3390/ijerph17207519

- Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), 401–419. doi: 10.1590/s1415-475738420150053
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T. Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., & Leontievsky, A. A. (2015). Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188-195. doi: 10.1134/S0003683815020209
- Travaglia, C., Masciarelli, O., Fortuna, J., Marchetti, G., Cardozo, P., Lucero, M., Zorza, E., Luna, V., & Reinoso, H. (2015). Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum sp.* and *Pseudomonas sp.* *Crop Protection*, 77, 102-109. doi: 10.1016/j.cropro.2015.07.003
- Ubabakar, Y., Tijjani, H., Egbuna, C., Adetunji, C. O., Kala, S., Kryeziu, T. L., Ifejeme, J. C., & Patrick-lwuanyanwu, K. C. Pesticides, History, and Classification. *Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*, 29-42. doi: 10.1016/b978-0-12-819304-4.00003-8
- Ukhurebor, K. E., Aigbe, U. O., Onyancha, R. B., & Adetunji, C. O. (2021). Climate Change and Pesticides: Their Consequence on Microorganisms. In C. O. Adetunji, D. G. Panpatte & Y. K. Jhala (Eds.), *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment* (Vol. 3, pp. 83-113). Springer.
- Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616-617, 255–268. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.309
- Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163–1172. doi: 10.1351/pac200173071163
- Xu, B., Sun, Q. J., Lan, J. C. W., Chen, W. M., Hsueh, C. C., & Chen, B. Y. (2019). Exploring the glyphosate-degrading characteristics of a newly isolated, highly adapted indigenous bacterial strain, *Providencia rettgeri* GDB 1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(1), 80-87. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.01.012

Yadav, I. C., & Devi, N. L. (2017). Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental Science and Engineering*, 6, 140-158.

Anexos

Anexo 1: Entrevista realizada al dueño del predio en Nealtican y apéndice Norma Oficial Mexicana NOM-AA-105-1988 "Plaguicidas Determinación De Residuos En Suelo - Metodo De Toma De Muestras".

¿Desde hace cuánto tiempo tiene el terreno?

¿Desde hace cuánto tiempo lo empezó a trabajar?

¿Con qué frecuencia le administran fertilizantes o pesticidas?

¿Qué es lo que más siembra?

¿Deja descansar el suelo entre siembras?

¿Deja secar el abono antes de administrarlo?

¿Cuáles son las principales plagas que detecta? ¿Con qué frecuencia?

Donde compra los agroquímicos ¿Le explican cómo emplearlos o los utiliza de acuerdo a su experiencia?

¿Cómo calcula la dosis a administrar?

¿Utiliza equipo de protección personal?

¿Siembran en temporada de lluvia?

¿Cuándo administra su fertilizante/pesticida? (Al momento de la siembra, durante el desarrollo de la planta, solo cuando hay presencia de plaga, etc.)

¿Cómo lo administra? (Con aspersor, directo al suelo, etc.)

¿Cuál es el rendimiento de sus cosechas? (Orgánica y con agroquímico).

¿Qué hace con los envases vacíos de sus agroquímicos?

¿Utiliza los mismos agroquímicos para todas las siembras, o utiliza algunos específicos para plantas específicas?

Centro de Calidad Ambiental

APENDICE

MUESTRA NUM _____

- 1.- NOMBRE DEL RESPONSABLE DEL PREDIO _____
- 2.- DIRECCION POSTAL _____
- 3.- LOCALIZACION DEL PREDIO _____
 ESTADO _____ MUNICIPIO _____
 COLONIA O EJIDO _____ No.DE LOTES _____
- 4.- FECHA Y HORA _____
- 5.- SUPERFICIE DE TERRENO EN HECTAREAS
 DE RIEGO _____ DE TEMPORAL _____ DE HUMEDAD _____
- 6.- FUENTE DE AGUA _____
- 7.- NUMERO DE MUESTRAS DE SUELO _____
 PROFUNDIDAD _____
 NUMERO DE MUESTRAS DE SUBSUELO _____
 PROFUNDIDAD _____
- 8.- CULTIVO EXISTENTE _____
 CULTIVO ANTERIOR _____
- 9.- APLICACION DE PLAGUICIDAS (INSECTICIDAS, FUNGICIDAS, HERBICIDAS, ETC.)

 CUALES Y CUANTO EN EL PRESENTE CICLO _____

 CUALES Y CUANTO EN EL ANTERIOR _____

- 10.- CULTIVO QUE VA A SEMBRAR _____
- 11.- OBSERVACIONES _____
- 12.- DATOS DEL RECOLECTOR:
 NOMBRE _____
 DOMICILIO _____
 INSTITUCION O EMPRESA QUE PERTENECE _____
 TELEFONO _____
 FIRMA DEL RECOLECTOR _____