

## ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS CON EFECTOS SUPRESIVOS EN EL CRECIMIENTO DE ARVENSES

### [ANALYSIS OF MICROORGANISMS WITH SUPPRESSIVE EFFECTS ON THE GROWTH OF WEEDS]

Esperanza Vendrell-Graméndez<sup>1§</sup>, Angélica del Carmen Ruiz-Font<sup>2</sup>, Emanuel Pérez-López<sup>3</sup>, Mercedes Muraira-Soto<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Tesista de la Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan. Av. Tecnológico No. 21. San Bartolo, Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68446. <sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla. Km 1.5 Tlaxcala, Tlax. C.P. 90700. <sup>3</sup>Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan. Av. Tecnológico No. 21. San Bartolo, Tuxtepec, Oaxaca. C.P. 68446.

<sup>§</sup>Autor para correspondencia: (L15810177@cpapaloapan.tecnm.mx).

### RESUMEN

El uso continuo del glifosato es un problema en la agricultura puesto que las arvenses (malezas) con el tiempo se hacen resistentes, y por sus compuestos químicos que perjudican la salud del ser humano y de los seres vivos que habitan cerca del área de cultivos; altera la textura del suelo y la diversidad microbiana al reducir las cantidades naturales y aumentar la población de fitopatógenos. Esta investigación se realizó con la finalidad de encontrar y aislar cepas microbianas, de diferentes tipos de suelos, con la capacidad de inhibir la germinación y crecimiento de arvenses; generando control biológico esperando que no dañen los cultivos, el ecosistema y la salud de operarios bajo protocolos de seguridad. Se utilizaron cinco especies de arvenses, pero solo dos tuvieron resultados favorables de germinación en pruebas con sustratos *Bidens ferulifolia* (rosilla) y *Urochloa plantaginea* (pasto, zacate), se calculó la tasa de germinación en los tres diferentes tipos de suelos (suelo acahual, pastos y agrícola), por medio de dilución se aislaron 13 diferentes cepas microbianas de los suelos, se inocularon y evaluaron el efecto depresor contra arvenses en pruebas de germinación bajo condiciones de laboratorio y campo. Como resultado, la cepa 10<sup>333</sup> obtenida del suelo pastos, se identificó como la morfología microbiana con mayor efecto depresor en los tres diferentes tipos de suelos y en las dos especies de malezas.

**Palabras claves:** Cepas microbianas, crecimiento de arvenses, depresor, inhibir, control biológico.

### ABSTRACT

The continuous use of glyphosate is a problem in agriculture since weeds (weeds) become resistant over time, and because of its chemical compounds that harm the health of human beings and living beings that live near the crop area; alters soil texture and microbial diversity by reducing natural amounts and increasing the population of phytopathogens. This research was carried out with the purpose of finding and isolating microbial cepec, from different types of soils, with the ability to inhibit the germination and weeds growth; generating biological control hoping that it does not damage crops, the ecosystem and the health of operators under safety protocols. Five species of weeds were used, but only two had favorable germination results in tests with substrates *Bidens ferulifolia* (rosilla) and *Urochloa plantaginea* (grass, grass), the germination rate was calculated in the three different types of soils (acahual soil, pastures and agricultural), by means of dilution, 13 different microbial strains were isolated from the soils, inoculated and evaluated for the depressant effect against weeds in germination tests under laboratory and field conditions. As a result, cepe 10<sup>333</sup>, obtained from grass soil, was identified as the microbial morphology with the greatest depressant effect in the three different types of soils and in the two weed species.

**Index words:** Microbial strain, weed growth, depressant, inhibit, biological control.

## INTRODUCCIÓN

En los Estados Unidos, el uso agrícola del glifosato durante los años de 1995 al 2014 aumentó a 113.4 millones de kg, mientras que en el uso agrícola mundial de glifosato aumento a 747 millones de kg (Benbrook, 2016). Con base a la gran cantidad de cultivos resistentes al glifosato que están autorizados en varios países, se estima que el uso del glifosato llegue alcanzar potencialmente los 1,000 millones de kg en todo el mundo para el 2023 (Mertens *et al.*, 2018); por lo que actualmente se están trabajando con experimentos en plantas arvenses con potencial como herbicidas ecológicos ofreciendo la ventaja de ser menos dañino para el entorno del humano y su medio ambiente.

La disminución de los precios de herbicidas a partir de la expiración de la patente en el año 2000 ha sido motivo por el cual ha aumentado el uso del glifosato en la agricultura (Bonny, 2016). De acuerdo a la Unión Mexicana de Fabricantes y Formuladores de Agroquímicos, A.C. (UMFFAAC), el mercado de agroquímicos en México tiene un valor anual aproximado de 15,684 millones de pesos (COFECE, 2015). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) indican que tan solo en el 2013 se aplicaron 31,195 t de herbicidas (Arellano-Aguilar and Rendon Von Osten, 2016).

Conforme se van desarrollando nuevas herramientas para la química orgánica sintética se ha conducido una variedad de compuestos útiles entre ellos los herbicidas, fungicidas, insecticidas, rodenticidas, nematocidas y compuestos promotores del crecimiento vegetal (Aktar *et al.*, 2009).

Entre 1996 y 2010, se registraron 53 productos químicos derivados de microbios en la Agencia Ambiental de los Estados Unidos (EPA) para el manejo de cultivos, bosques o ecología (Harding and Raizada, 2015). A partir de 2014, se aprobaron 47 cepas microbianas diferentes en la Unión Europea (UE) con el fin de controlar hongos o insectos, sorprendentemente, no hay microbios aprobados para el control de especies de malezas en la UE (Parliament, 2014). Se ha argumentado que la dispersión involuntaria de especies biológicas de control de malezas introducidas puede limitarse mediante el empleo de agentes que no pueden sobrevivir sin su huésped particular, como ciertas cepas de *Xanthomonas* (Schaad *et al.*, 2001).

Por lo anterior, varios autores mencionan cepas microbianas para controlar las malezas en los cultivos agrícolas en Estados Unidos, sin embargo, en México no hay registros o mención alguna sobre control biológico a base de bacterias, sobre todo, que éste se haya realizado con cepas extraídas de suelos propios del país para lograr inhibir o contrarrestar las arvenses, es por ello que se pretende encontrar en tres diferentes tipos de suelos alguna bacteria con efecto supresor de arvenses.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada durante el periodo de junio de 2019 a enero de 2020. La metodología de recuento en placa por plaqueo, desarrollada por Hoben y Somasegaran (1982), es una metodología ampliamente utilizada (Corral-Lugo *et al.*, 2012), que consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 100µl de cada dilución en una placa, para tal actividad se recolectaron tres suelos diferentes en diferentes lugares, y se inocularon en medio de cultivo de agar y tripton (MCAT), en donde se hicieron siembra de las diferentes morfologías por cuadrante, como resultado de estas siembra se lograron aislar 13 bacterias, las otras siete bacterias se tomaron de la colección del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA). Se recolectaron semillas de cinco diferentes arvenses en el municipio de Tepetitla, Tlaxcala. De las semillas recolectadas se realizaron pruebas de germinación de las diferentes semillas de arvenses en placas de Petri. Posteriormente, con las bacterias aisladas, se midieron los halos en medio líquido de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP) desarrollado por Nautiyal en 1999 (Scattareggia, 2016). Con referencia a lo anterior, por medio de

la inoculación de bacterias en placas de Petri, se evaluaron, por promedio, el crecimiento de las arvenses en los diferentes suelos.

### **Recolección del material orgánico**

Para la toma de muestras de suelo se consideró la metodología propuesta por Espinosa *et al.* (2012). El suelo pastos se obtuvo del municipio San Juan Bautista Valle Nacional, el cual forma parte de la región de la Cuenca del Papaloapan y del distrito de Tuxtepec, con coordenadas extremas de 17° 38' - 17° 57' de latitud norte y 96° 08' - 96° 31' de longitud oeste, y su altitud va de 0 a 3,000 m. El suelo acahual se extrajo del municipio de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, tiene una latitud de 18°19' norte y 17°48' sur; y a una longitud de 95°51' al este y 96°19' al oeste, en los límites del estado de Veracruz en la llamada Cuenca del Papaloapan. El suelo agrícola se consiguió del municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala, a unos 500 m del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA), este municipio se encuentra en una altitud media de 2,221 y una máxima de 2 260 msnm, con coordenadas 19°N 98° O.

Se colectaron semillas de cinco diferentes tipos de arvenses: *Cyperus esculentus*, *Bidens ferulifolia*, *Phelium protense*, *Seteria pumila* y *Urochloa plantaginea*; estas semillas fueron recolectadas, en el municipio de Tepetitla de Lardizabal, a 100 m del CIBA. Este municipio se encuentra en una altitud media de 2,221 y una máxima de 2,260 m, en las coordenadas 19°N 98° O.

### **Aislamiento de bacterias**

Primero mediante la dilución seriada como lo propone Madigan *et al.* (2003) se sembraron las bacterias en placas con medios de MCAT, para después aislarlas. Siguiendo los protocolos correspondientes se pesó 1 gr de cada suelo, se ocuparon 10 tubos de ensaye por cada tipo de suelo, en cada tubo se vertieron 9 ml de agua esterilizada, en el primer tubo se diluyó el gramo de suelo, posteriormente se agitó y se extrajo con 1 ml para agregarlo al siguiente tubo, hasta llegar a la 10<sup>10</sup> dilución. Este procedimiento se realizó con los tres tipos de suelos (suelo pastos, suelo acahual y suelo agrícola). Mediante la siembra estriada por cuadrante se aislaron las bacterias en las placas de Petri con medio de MCAT, se hicieron dos repeticiones por cada morfología y se guardaron en un cuarto de incubación a 30 °C por 24 h.

### **Pruebas bioquímicas en NBRIP y NFMM**

Por cada placa de Petri se colocaron cuatro tipos diferentes de morfologías microbianas, los cuales anteriormente se aislaron, poniendo por cada placa un Gram positivo de lado izquierdo y un Gram negativo de lado derecho (Figura 1). Se hicieron tres repeticiones en las pruebas: medio líquido de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP, por sus siglas en inglés) y medio para bacterias fijadoras de Nitrógeno (NFMM).

### **Pruebas de germinación en placas de Petri**

Se desarrolló una propuesta de protocolo de lavado de semillas consistiendo en: 6.7% de hipoclorito de sodio (Clorox®), 2.3% de jabón líquido (Axió®) y 91% de agua destilada esterilizada, se colocaron las semillas dentro de la solución y se agitó por un min. Se enjuagó con alcohol al 70 y 30% de agua destilada, se volvió a agitar por un min; por último, se enjuagaron dos veces solo con agua destilada estéril para eliminar todo el alcohol de las semillas; posterior a la aplicación del protocolo se pusieron a germinar las cuatro diferentes especies de semillas de arvenses. En placas de Petri se introdujeron 15 gr de sustrato (de cada tipo de suelos) por cada placa, se colocaron 10 semillas de una sola especie, esto se hizo en las cinco especies que estuvieron a prueba para observar su germinación. Se hicieron repeticiones por triplicado.



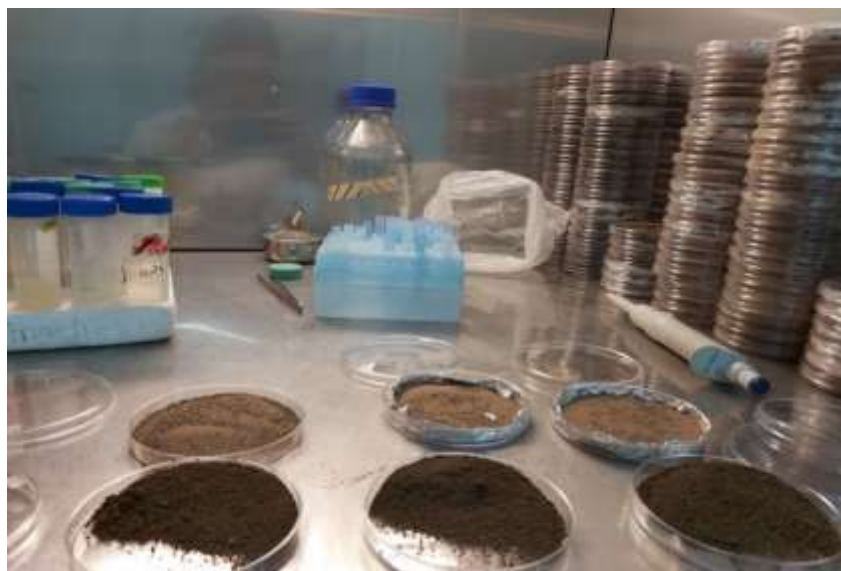
**Figura 1.** Pruebas de bacterias B19, B18, M510 y M54 en medio NBRIP. Fuente: Elaboración propia.

### Pruebas de germinación en charolas

Se desarrolló en charolas de 14 x 14 x 4.5 cm de largo, ancho y altura, respectivamente; se agregaron 30 gr de cada tipo de suelo en prueba, posteriormente se colocaron 15 semillas de las siguientes arvenses: *C. esculentus*, *P. protense*, *S. pumila*, *B. ferulifolia* y *U. plantaginea*. Se utilizaron 75 charolas para los tres tratamientos, se ocuparon tres charolas para control positivo y cinco para control negativo.

### Desarrollo de inoculación en placa Petri

Para poder evaluar el efecto de inoculación se utilizaron 360 placas de Petri, en tres tratamientos diferentes, en cada suelo (sac, sp y sagro) por dos especies de semillas (*B. ferulifolia* y *U. plantaginea*) por 20 cepas bacterianas, haciendo por triplicado para cada bacteria, teniendo como control positivo la cepa C21 y como control negativo solo los suelos con semillas sin bacterias. En cada placa de Petri se colocó papel aluminio y se agregaron 15 gr de suelo; cada placa de Petri con suelo se inoculó con 3 ml cada una (Figura 2).



**Figura 2.** Inoculación de suelos sac, sagro y sp.

Después se depositaron 30 semillas por placa las cuales anteriormente fueron lavadas como se realizó en los bioensayos anteriores, se agregaron 5 ml de agua destilada estéril por cada placa. Se evaluaron por 15 días, observando por día los efectos de la inoculación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de bacterias

Se aislaron 20 tipos diferentes obtenidos de diferentes lugares, algunos de los suelos utilizados como sustratos y otras cepas ya pertenecían a la colección del CIBA. Obteniéndose las cepas: 10332, 103, 10333, 1035, 1031, 1036, 1038, 1086, 10353, 1033, 103 sagro, MF32, MF34, MF42, MF44, M513, C19, C21 y C15.

### Medición de halo

En la siembra de bacterias en medios de cultivos de MCAT se obtuvieron 20 tipos de morfologías diferentes; después de aislarlas en estriado por cuadrante se le hicieron pruebas bioquímicas en NFMM, donde se obtuvieron los siguientes resultados de acuerdo con su longitud de halo (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** UFC recuperado.

| Suelos  | Colonias con crecimiento en Nitrógeno | Colonias con crecimiento en fosfato |
|---------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Pastos  | 8                                     | 6                                   |
| Acahual | 0                                     | 0                                   |
| Agro    | 1                                     | 1                                   |

Fuente: Elaboración propia.

### Germinación de arvenses en placas de Petri

1. Germinación de arvenses en suelo acahual (sac). El arvense con mayor germinación es *B. ferulifolia*, germinando a partir del día 5 con un 3.3% de germinación, seguido de *U. plantaginea* germinando a partir del día 7 con un 6.7% sobre el total de semillas puestas, alcanzando así un total del 30% en rosilla y 10% en pastos para el último día del periodo acordado.
2. Germinación de arvenses en suelo pastos (sp). *B. ferulifolia* al segundo día empezó a germinar con un 3.33%, teniendo al final del periodo un 67%; mientras que en la especie *U. plantaginea* empezó a germinar a partir del día 4 con un 13% de germinación sobre el total, al finalizar el periodo a prueba se obtuvo un total del 70%, siendo este suelo es el más probable a tener una mayor tasa de germinación.
3. Germinación de arvenses en suelo agrícola (sagro). Para el día 7, tanto la especie rosilla (*B. ferulifolia*) como pasto (*U. plantaginea*) obtuvieron un 6.7% de germinación, el arvense *U. plantaginea* germinó solo el 10%, el cual se mantuvo así hasta finalizar el periodo. Por el contrario, la especie rosilla alcanzó un 17% de germinación, lo cual indica que solo lograron germinar cinco semillas del total de 30 (Figura 5).

### Germinación de arvenses en charolas

1. Germinación de arvenses en suelo pastos (sp). La especie rosilla inició su germinación en suelo estéril con una semilla en el día 3 posterior al inicio de la siembra lo cual es equivalente al 2.2%, mientras

que en suelo no estéril comenzaron a brotar a partir del día 10 con un 4.4% de germinación y finalizando con el 13.3% sobre el total de semillas (45 semillas). La semilla de pasto en suelo estéril comenzó su germinación al igual que rosilla en suelo no estéril, a partir del día 16 y finalizó su periodo de prueba con el 31.1% de germinación. Mientras que en suelo no estéril la germinación final coincidió con la de rosilla en suelo no estéril, a diferencia que, en esta prueba comenzó la germinación a partir del día 9 con un 2.2%

2. Germinación de arvenses en suelo acahual (sac). Se encontró que las semillas de *U. plantaginea* fue la que mayor tasa de germinación presentó en esta prueba, en suelo estéril comenzó a partir del día 7 con un total de cinco semillas y finalizando con 15 semillas, lo cual es equivalente al 33.3% de germinación; mientras que en suelo no estéril comenzó a partir del día 11 con dos semillas y finalizando el periodo con el 31.1% sobre el total de semillas. Por lo que respecta a las semillas de *B. ferulifolia* en suelo estéril la germinación comenzó el día 2 y finalizó con el 33.3%, en suelo no estéril la germinación comenzó el día 14 con un porcentaje del 2.2 y finalizando con un 4.4% de germinación, siendo ésta la más baja.
3. Germinación de arvenses en suelo agrícola (sagro). La germinación se logró en tres especies de arvenses, en *S. pumila* comenzó su crecimiento a partir del día 10 con un 6.6% de germinación y manteniéndose así hasta finalizar el periodo. Para *B. ferulifolia* tanto en suelo estéril como no estéril, la germinación inició con un 2.2%, en suelo estéril terminó con un 37.8%, mientras que en el suelo no estéril fue de 31.1%. Por el contrario, la semilla de pasto fue la que más dominó, puesto que en el suelo estéril comenzó a germinar a partir del día 9 y finalizando con el 84.4%, mientras que en suelo no estéril comenzó la germinación a partir del día 7 y finalizando con el 50% sobre el total de semillas.

### **Resultado final de cepa microbiana como supresora contra arvenses**

En el cuadro 2 se muestra la comparación de los diferentes sustratos, suelo pastos, suelo acahual y suelo agrícola (sp, sac y sagro), se muestra el promedio que se obtuvo por cada una de las cepas microbianas durante los 15 días, el cual fue el periodo que se estuvo a prueba las cajas de Petri con los sustratos inoculados.

Es importante mencionar que, a pesar de que algunas cepas obtuvieron al finalizar los 15 días la misma cantidad de semillas, no comenzaron a brotar en los mismos días, algunos iniciaron al quinto día y otros por el contrario hasta el día 12 o 14, es por ello que los promedios varían y por lo tanto se toma a la cepa 10333 como la bacteria con mayor probabilidad de efecto supresor contra arvenses, pues es la de menor número de semillas germinadas y en un plazo más largo, por lo que da credibilidad a tener un efecto más fuerte como inhibidor contra malezas.

Según Bailey *et al.* (2010) el control biológico como término general se refiere a la introducción de organismos en un ecosistema con la intención de controlar una o más especies indeseables. En el contexto del control de malezas y especies de plantas invasoras, este campo de estudio se ha centrado cada vez más en bacterias y hongos en las últimas cinco décadas (Li *et al.*, 2003), aunque los virus también se han considerado para este propósito en casos seleccionados (Elliott *et al.*, 2009; Díaz *et al.*, 2014).

Acorde a los señalado por Bailey *et al.* (2010), uno de los organismos que se tuvieron que utilizar fueron las cepas microbianas adquiridas de los suelos, las cuales comprobaron por medio de Inoculaciones ser positivas a supresoras contra arvenses, por lo que respecta al hecho que si se pueden utilizar cepas microbianas para lograr contrarrestar o inhibir el crecimiento de las arvenses, el cual ha sido, desde tiempo atrás, una problemática en los campos de cultivo.

**Cuadro 2.** Promedio de la germinación de *B. ferulifolia* y *U. plantaginea* en las cepas microbianas en los diferentes sustratos.

| Cepa microbiana | Suelo acahual |     | Suelo pastos |     | Suelo agrícola |     | Total |
|-----------------|---------------|-----|--------------|-----|----------------|-----|-------|
|                 | BF            | UP  | BP           | UP  | BF             | UP  |       |
| Control         | 11            | 0   | 4.3          | 0   | 0.5            | 0   | 15.8  |
| 1036            | 2.5           | 0   | 0.5          | 0   | 0.6            | 0.5 | 3.6   |
| B1              | 1.9           | 0   | 0.3          | -   | 1.7            | 0   | 3.9   |
| B35             | 1.7           | 0   | 0.5          | 0   | 0.8            | 0   | 3     |
| MF44            | 1.6           | 0   | 0            | 0   | 1.7            | 0   | 3.3   |
| 1035            | 1.5           | 0.8 | 1.6          | 0   | 1.6            | 0   | 5.5   |
| C21             | 1.5           | 0   | 0            | 0   | 0.9            | 0   | 2.4   |
| 10331           | 1.4           | 0   | 1.2          | 0.1 | -              | 0   | 2.7   |
| 103 sagro       | 1.1           | 0   | 1.5          | 0.1 | 0.3            | 0   | 3     |
| 1033            | 1.1           | 0   | 3.2          | 0   | 2.8            | -   | 7.1   |
| C15             | 1             | 0   | 0.5          | 0   | 0.7            | 0   | 2.2   |
| 1031            | 0.9           | 0   | 0.3          | 0   | 0.2            | 0   | 1.4   |
| B3              | 0.8           | 0   | 0            | 0   | -              | 0   | 0.8   |
| 10332           | 0.7           | 0   | 0.1          | 0   | 0.5            | 0   | 1.3   |
| M513            | 0.6           | 0   | 0.7          | 0   | 1.1            | 0   | 2.4   |
| C19             | 0.6           | 0   | 1.1          | 0   | 0.4            | 0   | 2.1   |
| MF42            | 0.5           | 0   | -            | -   | 0.8            | 0   | 1.3   |
| 103             | 0.5           | 0   | -            | -   | 0              | 0   | 0.5   |
| 10321           | 0.5           | 0   | 2            | 0   | -              | 0   | 2.5   |
| M510            | 0.4           | 0   | 0.1          | 0   | 0.1            | 0   | 0.6   |
| 10333           | 0             | 0   | 0            | -   | 0.3            | 0   | 0.3   |

BF= *B. ferulifolia*. UF= *U. plantaginea*.

Las semillas de *B. ferulifolia* iniciaron su germinación al segundo día del inicio en el suelo pastos y finalizando con el 67% de germinación, en el suelo acahual iniciaron en el día cinco y finalizando el periodo con 30% de germinación, mientras que, en el suelo agrícola comenzaron al séptimo día y finalizando con el 17%; todas estas placas de Petri se dejaron en un cuarto oscuro, a 30 °C, durante 20 días. Mientras que, las semillas *U. plantaginea* en suelo pasto comenzaron a germinar a partir del día 4 con un 13% de germinación y finalizando con un 70%, en el suelo acahual comenzó la germinación a partir del día 7 y finalizando con el 10% de germinación, en el suelo agrícola la semilla pastos comenzaron a brotar a partir del día 7 y finalizando con el 10%.

Martínez y de la Barrera (2020), experimentaron con la arvense *Lopezia racemosa*, la cual logró germinar después de 2 días de haber iniciado el experimento, con una temperatura de 35/25 °C. Teniendo 91.33% de germinación, después de 21 días de iniciado el experimento, fue disminuyendo con un potencial de agua cada vez más negativo hasta obtener un mínimo de 41.67%. Por otra parte, en su experimento con las semillas de *Rumex crispus* comenzaron a germinar desde el primer día de haber iniciado el experimento, independientemente de la temperatura en la que se encontraban, la germinación máxima después de 21 días de incubación tampoco se vio afectada, alcanzando así el 100% de germinación.

Tanto las arvenses que manejaron Martínez y de la Barrera (2020), como las que se utilizaron en este proyecto tuvieron un periodo similar de 20 días, las manejadas en el presente proyecto lograron un estimado del 90% de germinación a temperatura controlada de 30 °C, las diferentes semillas fueron puestas bajo condiciones de total oscuridad, agregándose continuamente agua destilada. Es importante destacar que existe un amplio rango de latencia absoluta, en la cual la germinación no se produce bajo ninguna condición, pasando por intensidades intermedias, donde las semillas pueden germinar en un rango de condiciones ambientales como puede ser la temperatura, la humedad y el ambiente gaseoso; y a medida que el grado de

latencia disminuye, se amplía el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación (Varela y Arana, 2011).

Para el caso de las semillas germinadas en charolas, éstas se colocaron en un invernadero, con temperatura ambiente promedio de 22°C con luz solar por el día, se agregaron 5 ml de agua destilada por las mañanas, teniendo una alta tasa de germinación en la arvense rosilla y pasto, llegando en algunos suelos al 100% de germinación. Lo expuesto anteriormente por los autores Varela y Arana (2011), las semillas en campo no se producen bajo ningún factor, mientras que en invernadero al no tener nutrientes es más difícil que crezcan y a parte que, la humedad depende del humano, mientras que en el campo es todo lo contrario.

Uno de los ejemplos según Bo *et al.* (2019) es *Streptomyces hydroscopicus*, la cual sus metabolitos se han utilizado para crear bioherbicidas que le han dado utilidad en todo el mundo. De igual manera, se ha estudiado el efecto supresor de *Pseudomonas fluorescens*, de la cual se ha investigado tres cepas con gran detalle, y se ha observado que inhiben el crecimiento y/o la germinación de las plantas mediante la producción de metabolitos extracelulares (Banowetz *et al.*, 2008).

De acuerdo con los resultados arrojados de la inoculación de germinación de las arvenses *B. ferulifolia* y *U. plantaginea*, en los tres diferentes sustratos (sp, sac y sagro), las bacterias  $10^{333}$  y  $10^3$  dieron como resultado entre el 0.3 y 0.5 como promedio, lo cual significa tener entre el 90 al 97% de efectividad como inhibidor en la germinación de arvenses, en suelo pastos se obtuvo el 100% de efectividad en la cepa  $10^{333}$ . Por lo cual se demuestra que estas cepas se suman al porcentaje de bacterias patógenas como inhibidor en la etapa de germinación de las arvenses en las plantas objetivos. De acuerdo con Banowetz *et al.* (2008), probablemente por medio de los metabolitos y sus reacciones enzimáticas, puede ser que posiblemente secreten una sustancia herbicida lo cual impide la germinación de las semillas de arvenses.

## CONCLUSIONES

Con base en las pruebas bioquímicas que se les realizaron a las cepas obtenidas se determinó que, para solubilizadores de fosfato, solo cuatro bacterias en NBRIP presentaron crecimiento de su halo mayor a 1 cm; mientras que, para fijadores de nitrógeno, seis bacterias, en NFMM, el halo logró medir 1 cm.

Respecto a la germinación de arvenses en agar agua, después de probar diferentes metodologías de lavado, la última fue la mejor, puesto que no se contaminaron, utilizando solo el 9% entre hipoclorito de sodio y jabón líquido, en el primer lavado y en el segundo alcohol al 70%.

En las pruebas de germinación con sustrato, el suelo que demostró mayor tasa de germinación es el que se extrajo de un terreno donde abundaba el pasto entre otras malezas, puesto que fue donde germinó un 70% en *U. plantaginea* y 66% en *B. ferulifolia*. Mientras que los otros suelos apenas obtuvieron entre el 10 al 20% de germinación. En el experimento en charolas, las semillas de pasto (*U. plantaginea*) y rosilla (*B. ferulifolia*) germinaron en un 70% en suelo agrícola, siendo ahora el suelo pastos el segundo suelo con un rango de germinación alto.

La prueba de inoculación de las cepas microbianas en placas de Petri para observar su efectividad como depresoras contra arvenses demostró que de las 20 morfologías la cepa  $10^{333}$  con un promedio de 0.3, con una casi nula germinación tanto en pasto (*U. plantaginea*) y rosilla (*B. ferulifolia*) en los diferentes sustratos (sac, sp y sagro), teniendo como respaldo la tasa de germinación en sustratos sin inocular, la germinación fue abundante tanto en rosilla como pasto.

## AGRADECIMIENTOS

Al Tecnológico Nacional de México, al Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan, al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, a la Dra. Angélica del Carmen Ruiz Font, por su dirección en las actividades y desarrollo de este proyecto de investigación y a la Ing. Blanca Paulette Islas Aldama, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Aktar, W., D. Sengupta and A. Chowdhury. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- Arellano-Aguilar, O. and J. Rendon-Von Osten. 2016. La huella de los plaguicidas en México. Greenpeace, 39. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.11406.36168>.
- Bailey, K.L., S.M. Boyetchko and T. Langle. 2010. Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biological control*, 221-229. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.003>.
- Banowetz, G.M., M.D. Azevedo, D.J. Armstrong, A.B. Halgren and D.I. Mills. 2008. Germination-arrest factor (GAF): Biological properties of a novel, naturally-occurring herbicide produced by selected isolates of rhizosphere bacteria. *Biol. Control*. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.04.016>.
- Benbrook, C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*, 28. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- Bo, A.B., J.D. Kim, Y.S. Kim, H.J. Kim, B. Khaitov, K.Y. Ko and J.S. Choi. 2019. Isolation, identification and characterization of *Streptomyces* metabolites as a potential bioherbicide. *Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222933>.
- Bonny, S. 2016. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: overview and impact. *Environmental Management*. <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0589-7>.
- Comisión Federal de Competencia Económica (COFEC). 2015. Reporte sobre las condiciones de competencia en el sector agroalimentario. México. 576 p. Consultado en: [https://www.cofece.mx/cofeco/images/Estudios/COFEC\\_reporte%20final-ok\\_SIN\\_RESUMEN\\_ALTA\\_RES-7enero.pdf#pdf](https://www.cofece.mx/cofeco/images/Estudios/COFEC_reporte%20final-ok_SIN_RESUMEN_ALTA_RES-7enero.pdf#pdf).
- Corral-Lugo, A., Y.E. Morales-García, L.A. Pazos-Rojas, A. Ramírez-Valverde, R.D. Martínez-Contreras and J. Muñoz-Rojas. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (2), 147-156. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>.
- Díaz, R., V. Manrique, K. Hibbard, A. Fox, A. Roda and I. Gandolfo. 2014. Successful biological control of tropical soda apple (Solanales: Solanaceae) in Florida: A review of key program components. *Florida Entomologist* 97: 179-190. <http://dx.doi.org/10.1653/024.097.0124>.
- Elliott, M.S., B. Massey, X. Cui, E. Hiebert, R. Charudattan and N. Waipara, N. 2009. Supplemental host range of *Araujia mosaic virus*, a potential biological control agent of moth plant in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38, 603–607. <https://doi.org/10.1071/AP09046>.
- Espinosa, R.M., CH.F.E. Ortiz and V.E. Vargas. 2012. Muestreo de suelos y preparación de muestras. INIFAP-SAGARPA, México. 2 p. Consultado en: <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/935.pdf>.
- Harding, D.P. and M.N. Raizada, M. N. 2015. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00659>.
- Hoben, H.J. and Somasegaran, P. 1982. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peatt. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (5): 1246-1247.
- Li, Y.Q., Z.L. Sun, X.F. Zhuang, S.F. Chen and M.Z. Li. 2003. Research progress on microbial herbicides. *Crop Protection*. Volume 22 (2). 247-252. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00189-8).

- Madigan, M., J. Martinko, J. Parker and P. Brock. 2003. *Biología de los microorganismos*. 10° edición. Prentice Hall Iberia. España.
- Martínez, D. y E. de la Barrera. 2020. Ecofisiología de la germinación de tres malezas efímeras periurbanas en Morelia, Michoacán, México. *Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 31. No. 1. pp. 47-55. <https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.03>.
- Mertens, M., S. Höss, G. Neumann, J. Afzal and W. Reichenbecher. 2018. Glyphosate, a chelating agent-relevant for ecological risk assessment? *Environ Sci Pollut Res Int*. 25(6). 5298-5317. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1080-1>.
- Parliament, E. 2014. Commission implementing regulation (EU). Obtenido de Commission Implementing Regulation (EU): <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02011R0540-20140901&from=EN>.
- Scattareggia, J.P. 2016. Aislamiento y selección de Bacterias Solubilizadoras de Fósforo de un suelo cultivado con tomate para industria (*Solanum lycopersicum* L.). Universidad Nacional de Cuyo. Argentina. pp. 62. Consultado en: [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/8408/tesis-irnr-scattareggia-juan-pablo-2016.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/8408/tesis-irnr-scattareggia-juan-pablo-2016.pdf).
- Schaad, N.W., W. Song, S. Hutcheson and F. Dane. 2001. Gene tagging systems for polymerase chain reaction-based monitoring of bacteria released for biological control of weeds. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23 (1), 36-41. <https://doi.org/10.1080/07060660109506906>.
- Varela, S. y V. Arana, V. 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. INTA. Argentina. P. 10. Consultado en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_latencia.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_latencia.pdf).