

Efecto de la pendimentalina sobre el crecimiento celular de rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPR)

Effect of pendimentalin on the cell growth of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

Cristhian Macías-Holguin¹; Dayanara Tapia-Quintana¹; Hayron Canchignia-Martínez¹; Agustina Villasagua-Villasagua²; Carlos Miranda-Salas³; Luis Vera-Benites^{1*}

1 Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Biotecnología (PGPR), Campus Experimental La María, Carrera de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 1.5 a Santo Domingo de los Tsáchilas, EC. 120501, Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

2 Dirección de Gestión de Riego y Drenaje Fortalecimiento de la Prefectura de los Ríos: Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.

3 Unidad Educativa Fiscal Guayaquil: Guayaquil, Guayas, Ecuador.

* Autor correspondiente: luisf.vera@uteq.edu.ec (L. Vera-Benites).

ORCID de los autores:

C. Macías-Holguin: <https://orcid.org/0000-0003-2068-8503>

H. Canchignia-Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-1195-5446>

C. Miranda-Salas: <https://orcid.org/0009-0000-7787-8717>

D. Tapia-Quintana: <https://orcid.org/0009-0004-0370-7893>

A. Villasagua-Villasagua: <https://orcid.org/0009-0009-2780-1979>

L. Vera-Benites: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1919>

RESUMEN

La pendimentalina es un herbicida usado en cultivos de ciclo corto. Su uso indiscriminado reduce la población benéfica de microorganismos en los sistemas productivos. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la pendimentalina sobre el crecimiento celular de rizobacterias. La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, donde se realizaron los siguientes experimentos con contaminación de pendimentalina: 1) Adaptabilidad de las rizobacterias en condiciones in vitro; 2) Niveles de tolerancia de las rizobacterias bajo diferentes condiciones abióticas in vitro; 3) Reducción de estrés por rizobacterias en suelos. Las rizobacterias presentan una mayor adaptabilidad a las 72 h con absorbancia de 2,38 y 2,51 en las cepas (CHA0, BA4-19, B03-4, PM3-14 y R4), además durante este tiempo establecen un pH neutro, a pesar de las condiciones ácidas y alcalinas. La cepa CHA0 presentó mayor número de células bajo pH neutro ($1,09E+09$ UFC/mL). Las cepas BA4-19 y PM3-14 demuestran una leve mejora en los aspectos morfológicos. Las rizobacterias tienen una adaptabilidad a nivel in vitro, pero su uso disminuye levemente la toxicidad del herbicida en procesos de germinación y crecimiento de arroz.

Palabras clave: pendimentalina; crecimiento celular; Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal; herbicida; toxicidad.

ABSTRACT

Pendimentalin is an herbicide used in short-cycle crops. Its indiscriminate use reduces the beneficial population of microorganisms in production systems. The objective of this work was to evaluate the effect of pendimentalin on the cell growth of rhizobacteria. The research was conducted at the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology of the State Technical University of Quevedo, where the following experiments with pendimentalin contamination were carried out: 1) Adaptability of rhizobacteria under in vitro conditions; 2) Tolerance levels of rhizobacteria under different abiotic conditions in vitro; 3) Reduction of stress by rhizobacteria in soils. The rhizobacteria show a higher adaptability at 72 h with absorbance of 2.38 and 2.51 in the strains (CHA0, BA4-19, B03-4, PM3-14 and R4), also during this time they establish a neutral pH, despite the acidic and alkaline conditions. Strain CHA0 presented the highest number of cells under neutral pH ($1.09E+09$ CFU/mL). Strains BA4-19 and PM3-14 showed a slight improvement in morphological aspects. Rhizobacteria have adaptability at the in vitro level, but their use slightly reduces the toxicity of the herbicide in rice germination and growth processes.

Keywords: pendimentalin; cell growth; Plant Growth Promoting Rhizobacteria; herbicide; toxicity.

Recibido: 08-05-2024.

Aceptado: 05-08-2024.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

INTRODUCCIÓN

Pendimethalin [N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina] es un herbicida pre-emergente que pertenece a la familia de las dinitroanilinas (Vera et al., 2023). Este herbicida actúa sobre la división celular y su acción se produce porque impide la formación de microtúbulos durante la división mitótica de las células (Appleby & Valverde, 1989). Por lo general, es usado antes de la siembra en cultivos de ciclo corto (Onwuchekwa-Henry et al., 2023). Sin embargo, el constante uso y las altas dosis generan contaminación a los acuíferos a través de escorrentía, lixiviación, evaporación y deriva. Además, ocasionan reducción de la microbiología del suelo, necrosis y disminución de la biomasa foliar y radicular en plantas (Juraeva et al., 2023; Khaliq & Matloob, 2012; Pinilla, 2020). Se han reportado contaminación de pendimentalina y afectación a los habitantes en afluentes de aguas de Francia (840 ng/L); Brasil (0,06 y 0,38 µg/L), así mismo en Ecuador (0,170 – 0,557 µg/L) en la zona arroceras de la cuenca del río Guayas, por tal motivo, la constante aplicación de este herbicida es una amenaza para la salud humana (Deknock et al., 2019; Le Du-Carree et al., 2021; Qiao et al., 2021). Una alternativa para transformar los plaguicidas en compuestos más simples y reducir contaminantes en el ecosistema es mediante el uso del potencial metabólico de los microorganismos (Dubey, 2021; Hernández et al., 2017; Neamat-Allah et al., 2021; & Trivedi). Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal por sus siglas en inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) son conocidas por incrementar el desarrollo de las plantas, reducir el estrés biótico y abiótico, incluso mostrar propiedades tolerantes/degradantes a los pesticidas (Oleńska et al., 2020; Hkudaygulov et al., 2022).

Las PGPRs producen enzimas hidrolasa, oxidorreductasa, deshalogenasa, oxigenasa y transferasa, que funcionan mediante reacciones catalíticas para descomponer y reducir los contaminantes ambientales dañinos (Jeong & Choi, 2020; Saravanan et al., 2021). Además, estos microorganismos tienen varios mecanismos para tolerar los herbicidas, como la bioaumentación. Se considera una forma eficiente de remediar sitios contaminados con pendimentalina mediante la introducción de microorganismos degradantes específicos (Wang et al., 2018). Singh & Singh, (2020) demostraron que ciertas rizobacterias toleraban 1000 mg/L de pendimentalina en condiciones *in vitro*. Moyano (2015) señala que la degradación de pendimetalina por rizobacterias sucede existiendo una relación entre la temperatura y el pH. Rosado et al. (2020) reportaron que las bacterias *Acinetobacter pitii*, *Atlantibacter hermannii* y *Pseudomonas plecoglossicida* presentaron un crecimiento con 2.0 g/L con el pendimethalin, por lo tanto, son consideradas como tolerantes. En la actualidad, se han realizado métodos y procesos como técnicas de enriquecimiento, detección funcional, metagenómica, transferencia horizontal de genes y estrategias de ingeniería genética, para identificar microorganismos degradadores de pesticidas en los procesos de biodegradación y biomineralización (Verma et al., 2014). Sin embargo, en el Ecuador existen pocos reportes sobre rizobacterias tolerantes al pendimentalina como posible alternativa para su uso en suelos contaminados. En este contexto, como alternativa para prevenir la contaminación ambiental de pendimentalina, se planteó como objetivo evaluar el efecto de la pendimentalina sobre el crecimiento celular de las PGPR.

METODOLOGÍA

Ubicación

La investigación se realizó en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 7½ de la Vía Quevedo, El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos, coordenadas geográficas 1°04'51,7 latitud Sur 79°30'10,0" longitud Oeste, altitud de 66 m.s.n.m.

Selección y preparación del inóculo bacteriano

Del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Microbiología Molecular de la UTEQ, fueron

seleccionadas las rizobacterias provenientes de cultivares endémicos de musáceas con su clasificación a metabolitos secundarios (Tabla 1). Las rizobacterias se incubaron en 100 mL de King B (KB) líquido selectivo [(g/L): peptona de carne 20,0; glicerol, 15,0 mL; fosfato dipotásico; 1,5; sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5; agua destilada (pH 7,2)], suplementado con chloramphenicol (13 µg/mL), ampicilina (40 µg/mL) por 48 h (King et al., 1954).

Tabla 1
Rizobacterias seleccionadas productoras de metabolitos antagónicos y sideróforos

Cepas	Metabolitos antagónicos				Sideróforos
	PR	HCN	DAPG	Prn	
<i>Klebsiella variicola</i> , BO 3- 4	+	+	-	-	+
<i>Enterobacter asburiae</i> , BA 4- 19	+	-	-	-	+
<i>Pseudomona veronii</i> , R4	+	-	-	+	+
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , BMR 2- 12	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter asburiae</i> , PM 3- 14	+	+	-	+	+
<i>Pseudomonas protegens</i> , CHA0	+	+	+	+	+

Productoras de metabolitos secundarios: PR-proteasa HCN-cianuro de hidrogeno Prn-Pirrolnitrina, Sideróforos (Chávez- Arteaga et al., 2018; Montes et al., 2016).

Adaptabilidad de las rizobacterias a concentraciones de pendimetalina en condiciones *in vitro*

Las cepas fueron tomadas por individual, y se ubicaron en un Erlenmeyer de 50 mL con 40 mL de medio de cultivo King B líquido (KBL) g/L: (peptona 10 g, sulfato de magnesio 1,5 g, fosfato dipotásico 1,5 g y glicerina 15 ml suplementado con cloranfenicol 40 mg) a concentraciones de 0, 50, 100 y 150 mg/L de GRAMILAQ (pendimetalina 400 g/L). Las muestras se incubaron por 180 rpm a 28 °C durante 72 horas. A las 24, 48 y 72 horas se tomaron muestras para determinar las siguientes variables: pH mediante el potenciómetro OHAUS modelo STARTER y la absorbancia a 600 nm con el espectrofotómetro "UNICO" modelo 1205.

Niveles de tolerancia de las rizobacterias a la Pendimetalina bajo diferentes condiciones abióticas *in vitro*

Se seleccionaron 3 rizobacterias por su tolerancia a la pendimetalina. Las cepas se incubaron en KBL suplementado de 150 mg/L de GRAMILAQ® 400 en 40 mL. Los cultivos se ajustaron a diferentes pH, considerando que 5,0 y 6,5 se agregó ácido clorhídrico (HCl) al 0,1% y 8,0 hidróxido de sodio (NaOH) al 0,1 M. Las muestras se dejaron en incubación a 180 rpm durante 72 horas. Cada 24, 48 y 72 horas se tomaron las siguientes variables: Las UFC/ml se evaluaron con la metodología descrita por (Dickson, 1993). Los valores de pH mediante el potenciómetro OHAUS modelo STARTER y la absorbancia a 600 nm con el espectrofotómetro "UNICO" modelo 1205.

Reducción de estrés por rizobacterias en suelos contaminado con Pendimetalina

Se colectó muestra de suelo sobre los primeros 0,20 m de profundidad procedente de una finca productora de arroz, de la provincia de Los Ríos, Cantón "Mocache". El suelo se solarizó con la metodología

descrita por Navarro (1991). Después de 10 días, se homogenizó y se tamizó con una malla < 2 mm. El suelo se mezcló con turba y perlita en relación 3:1:1. El sustrato se llevó a Capacidad de Campo (CC), se agregó dosis de 0, 75 y 150 mg/kg de pendimetalina. Las muestras de suelo se incubaron durante 15 días, manteniendo en CC el sustrato. Las semillas del material de arroz INIAP FL - ÉLITE se esterilizaron de forma superficial con alcohol (70%) durante 30 s y NaOCl (1% V/V) durante 60 s, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se colocaron 10 semillas en cajas de Petri estériles que contenía 40 g de sustrato. Las rizobacterias del anterior experimento crecieron en KBL a 170 rpm durante 24 horas. De forma individual, se homogenizaron en relación v/v al 30% y se obtuvo una concentración celular de (8,6E+7 UFC/ml) aplicando 2 mL de la solución bacteriana alrededor del suelo. Las cajas de Petri se sellaron con papel parafilm y se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) bajo un fotoperiodo de 12 h luz-12 h oscuridad durante 96 h. Se tomaron las siguientes variables: semillas germinadas, crecimiento temprano (longitud de la raíz y del hipocótilo). El índice de vigor (IV) y el porcentaje de germinación se calculó con lo descrito por Aparicio et al. (2018) y Zucconi et al. (1981).

Diseño experimental y análisis de datos

Para los ensayos *in vitro* se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con factorial, para cepa y dosis de herbicida. Con tres réplicas y dos unidades experimentales. A nivel invernadero, se empleó un DCA con factorial, para cepas y dosis de pendimetalina. Cada tratamiento contenía tres repeticiones, con tres unidades experimentales, se evaluaron nueve plantas por tratamiento. Para el análisis se utilizó el software estadístico Infostat 2020 y la versión 19.1.0 del software Minitab (Di Rienzo et al., 2020; Minitab, 2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Densidad óptica de las rizobacterias a diferentes dosis de pendimetalina

Se presentó significancia estadística en los factores en estudio y las interacciones ($p < 0,0001$) durante las 24, 48 y 72 h. A las 24 h, las cepas CHA0 y BA4-19 con 150 mg/L mostraron mayor densidad óptica (2,28 y 2,27). A las 48 h se presentó un ligero incremento con 2,33 y 2,32. Esto evidencia que las rizobacterias en estudio tienen una rápida adaptabilidad al herbicida. Sin embargo, a las 72 h se evidenciaron que las cepas bacterianas (CHA0, BA4-19, B03-4, PM3-14 y R4) con aplicación de 150 mg/L tuvieron mayor absorbancia (2,38 y 2,51) a diferencia del sin aplicación (1,74 y 0,99) (Tabla 2). Esto indica que las rizobacterias, además de tolerar el herbicida puede seguir con sus actividades metabólicas para su desarrollo. La biodegradación por microorganismos comienza con oxidación,

reducción, hidrólisis y desalquilación; así como, diversas rutas metabólicas como el metabolismo energético mitocondrial, el metabolismo de los ácidos grasos y lípidos, el metabolismo de los aminoácidos, las vías oxidativas e hidrolíticas y la metilación (Singh & Singh, 2016; Guerrero Ramírez et al., 2023). El análisis de la dinámica poblacional de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli* muestran un aumento celular al consumir el herbicida como única fuente de carbono después de siete días después de la inoculación en el medio modificado con 125 mg/L pendimetalina (Avarseji et al., 2021). Esto concuerda con Kulshrestha et al., (2000) donde realizaron cuatro aplicaciones por dos años de pendimetalina en el cultivo de maíz observaron que a una superficie del suelo (0-15 cm) muestra mayor degradación del herbicida del 54%.

Tabla 2

Interacción de rizobacterias y dosis de pendimentalina sobre la densidad óptica

Cepas	Dosis	Densidad óptica 600 nm (horas)					
		24		48		72	
CHA0	150 mg/L	2,28 ± 0,01	a	2,33 ± 0,03	a	2,51 ± 0,05	a
BA4-19	150 mg/L	2,27 ± 0,02	a	2,32 ± 0,01	a	2,53 ± 0,01	a
B03-4	150 mg/L	2,23 ± 0,05	ab	2,31 ± 0	ab	2,38 ± 0	a
PM3-14	150 mg/L	2,20 ± 0,05	ab	2,33 ± 0,01	a	2,56 ± 0,01	a
R4	150 mg/L	2,15 ± 0,01	b	2,21 ± 0,01	abc	2,46 ± 0,01	a
BM2-12	150 mg/L	1,90 ± 0	c	1,97 ± 0,03	abcde	2,43 ± 0	a
CHA0	100 mg/L	1,58 ± 0,05	e	1,17 ± 0,14	gh	1,40 ± 0,02	ghi
BA4-19	100 mg/L	1,21 ± 0,01	f	1,86 ± 0,03	cde	1,86 ± 0,01	cd
B03-4	100 mg/L	1,70 ± 0,06	d	1,69 ± 0,55	def	1,75 ± 0,01	de
PM3-14	100 mg/L	1,30 ± 0,04	f	1,60 ± 0,03	ef	1,85 ± 0,02	cd
R4	100 mg/L	1,87 ± 0,05	c	1,94 ± 0,02	bcde	2,34 ± 0,02	ab
BM2-12	100 mg/L	1,88 ± 0,02	c	1,99 ± 0,02	abcd	2,09 ± 0,19	bc
CHA0	50 mg/L	0,69 ± 0,03	i	0,80 ± 0,03	ij	1,15 ± 0,21	ij
BA4-19	50 mg/L	0,21 ± 0,03	m	0,94 ± 0,02	hij	1,56 ± 0,03	efg
B03-4	50 mg/L	0,79 ± 0,01	h	1,35 ± 0,01	fg	1,48 ± 0,02	efgh
PM3-14	50 mg/L	0,76 ± 0,03	hi	1,08 ± 0,04	ghi	1,42 ± 0,02	gh
R4	50 mg/L	0,55 ± 0,01	jk	0,81 ± 0,02	hij	1,34 ± 0,04	ghi
BM2-12	50 mg/L	0,46 ± 0,01	kl	0,82 ± 0,02	hij	1,75 ± 0,01	de
CHA0	0 mg/L	0,81 ± 0	h	0,67 ± 0,01	j	1,23 ± 0,06	hij
BA4-19	0 mg/L	0,26 ± 0	m	0,72 ± 0	ij	1,47 ± 0,07	fgh
B03-4	0 mg/L	0,96 ± 0	g	1,15 ± 0,01	gh	1,74 ± 0,27	def
PM3-14	0 mg/L	0,56 ± 0	j	0,74 ± 0,01	ij	1,35 ± 0,03	ghi
R4	0 mg/L	0,74 ± 0,01	hi	0,75 ± 0,02	ij	1,41 ± 0,08	ghi
BM2-12	0 mg/L	0,45 ± 0,01	l	0,65 ± 0,02	j	0,99 ± 0,05	j
p (Cepas)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
p (Dosis)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
p (Interacción)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

pH de las rizobacterias a diferentes dosis de pendimentalina

Se presentó significancia estadística en los factores en estudio y las interacciones ($p < 0,0001$) a las 24, 48 y 72 h. A las 24 horas, la cepa BM2-12 tuvo un mayor incremento del pH cuando no existió la

aplicación de pendimentalina (7,55). A las 48 h, la cepa PM3-14 con 100 mg/L demostró un incremento en el pH (7,92) en comparación a los demás tratamientos. Sin embargo, a las 72 h la cepa BM2-12 sometida a 50 mg/L aumentó el pH (8,29) (Tabla 3).

Tabla 3

Interacción de rizobacterias y dosis de pendimentalina sobre el pH

Cepas	Dosis	pH (horas)					
		24		48		72	
CHA0	150 mg/L	7,35 ± 0,01	d	7,74 ± 0,01	d	7,88 ± 0,05	gh
BA4-19	150 mg/L	6,02 ± 0,01	r	7,28 ± 0,01	k	7,63 ± 0,01	k
B03-4	150 mg/L	6,73 ± 0,02	l	7,34 ± 0,01	j	7,93 ± 0	ef
PM3-14	150 mg/L	7,15 ± 0,01	h	7,52 ± 0,01	g	7,89 ± 0,01	fg
R4	150 mg/L	7,30 ± 0,01	e	7,74 ± 0,01	d	8,02 ± 0,01	d
BM2-12	150 mg/L	6,88 ± 0,05	i	7,46 ± 0,01	i	7,91 ± 0	efg
CHA0	100 mg/L	7,41 ± 0,01	c	7,66 ± 0,01	e	7,92 ± 0,02	efg
BA4-19	100 mg/L	6,32 ± 0,01	o	7,24 ± 0,01	l	8,11 ± 0,01	bc
B03-4	100 mg/L	6,15 ± 0,01	q	7,24 ± 0,01	l	7,84 ± 0,01	h
PM3-14	100 mg/L	7,45 ± 0,01	b	7,92 ± 0,01	a	7,11 ± 0,02	n
R4	100 mg/L	7,24 ± 0,01	f	7,49 ± 0,01	h	7,11 ± 0,02	n
BM2-12	100 mg/L	6,81 ± 0,01	j	6,81 ± 0,01	p	7,03 ± 0,19	o
CHA0	50 mg/L	7,41 ± 0,01	c	7,57 ± 0,01	f	8,03 ± 0,21	d
BA4-19	50 mg/L	6,27 ± 0,01	p	6,43 ± 0,01	r	7,70 ± 0,03	j
B03-4	50 mg/L	6,76 ± 0,01	kl	7,12 ± 0,01	n	7,78 ± 0,02	i
PM3-14	50 mg/L	6,65 ± 0,01	m	7,16 ± 0,01	m	7,53 ± 0,02	l
R4	50 mg/L	7,38 ± 0,01	cd	7,74 ± 0,01	d	8,09 ± 0,04	c
BM2-12	50 mg/L	7,19 ± 0,01	g	7,57 ± 0,01	f	8,29 ± 0,01	a
CHA0	0 mg/L	7,45 ± 0,01	b	7,84 ± 0,01	b	8,14 ± 0,06	b
BA4-19	0 mg/L	6,49 ± 0,01	n	6,64 ± 0,01	q	8,15 ± 0,07	b
B03-4	0 mg/L	6,79 ± 0,01	jk	6,95 ± 0,01	o	7,22 ± 0,27	m
PM3-14	0 mg/L	7,35 ± 0,01	d	7,77 ± 0,01	c	7,22 ± 0,03	m
R4	0 mg/L	7,45 ± 0,01	b	7,66 ± 0,01	e	8,09 ± 0,08	c
BM2-12	0 mg/L	7,55 ± 0,01	a	7,5 ± 0,01	h	7,95 ± 0,05	e
p (Cepas)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
p (Dosis)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
p (Interacción)		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

Es posible que la acción metabólica de las rizobacterias produzca reacciones alcalino-reductoras en dosis específicas de contaminantes, a su vez, la respuesta de las cepas al disminuir el pH podría estar influenciado por los ácidos orgánicos. Estas bacterias modifican el pH por la producción de ácidos orgánicos, en cambio cuando se parte con pH ligeramente alcalino, las bacterias regulan comenzando a las 96 h hasta obtener un pH neutro esto se da por la segregación de amonio a partir de desaminación de aminoácidos (Lei et al., 2023). *Clavispora lusitaniae* reduce el pH del 7,51 inicial a 5,5 durante la degradación de la pendimetalina a las 96 h post-incubación (Han et al., 2019). El aumento del pH de la solución juega un rol clave en la biosorción de herbicidas, probablemente podría atribuirse a la acumulación en el estado de ionización de los grupos funcionales como carboxilato, fosfato y grupos amino de la pared celular, compiten con iones que coexisten en la solución (Baxter & Cummings, 2008; Ibrahim et al., 2023).

Efecto del pH sobre la densidad óptica de las rizobacterias

Se presentó significancia estadística en los factores en estudio y las interacciones ($p < 0,0001$) a las 48 y 72 h. A las 24 h el pH alcalino y neutro afectó la densidad óptica de las rizobacterias, en comparación al pH ácido (5,0) donde mostró un mayor incremento en las cepas PM3-14, CHA0 y BA4-19 con 1,23, 1,19 y 1,1, respectivamente. A las 48 h se presentó un desarrollo de células en el pH neutro

y alcalino, sin embargo, existió mayor suspensión bacteriana en las rizobacterias PM3-14 y CHA0 con (1,6 y 1,6). Con respecto a las 72 h, se demostró una estabilidad en las células en pH ácido, neutro y alcalino (Tabla 4).

La bacteria BA 4-19 posee un creciente crecimiento microbiano acelera la tasa de degradación de pendimetalina en condiciones ambientales desfavorable consume la fuente alternativa de carbono, fosfato y energía del herbicida. En esta etapa, las células se dividen mediante fisión binaria y duplican su número después de cada tiempo de generación (Doolotkeldieva et al., 2018). La actividad metabólica es alta debido a la capacidad de las bacterias que utilizan el glifosato de carbono como fuente de energía para el crecimiento y la división celular (Li et al., 2021). La cinética de crecimiento celular de la bacteria GP-1 genera proceso de descontaminación del Glifosato de 1000 ppm a partir de octavo día (Malviya et al., 2015).

Efecto del pH sobre las rizobacterias

Se presentó significancia estadística en los factores en estudio y las interacciones ($p < 0,0001$) a las 24, 48 y 72 h. A las 24 h, el pH alcalino presentó una disminución en la cepa CHA0 con (7,7), sin embargo, en condiciones ácidas, se evidenció un incremento con las cepas PM3-14, CHA0, BA4-19 con (6,8, 7,0 y 6,7) respectivamente. A las 48 y 72 h se presentó una estabilidad en el pH desde ligeramente alcalino a casi neutro (Tabla 5).

Tabla 4

Interacción de rizobacterias y pH sobre la densidad óptica

Cepas	pH	Densidad óptica 600 (horas)											
		24				48				72			
PM3-14	5,0	1,20	±	0,14	a	1,60	±	0,01	a	2,00	±	0,01	a
CHA0	5,0	1,20	±	0,07	a	1,60	±	0,01	a	1,70	±	0,01	b
BA4-19	5,0	1,20	±	0,13	a	1,20	±	0	b	2,00	±	0	a
PM3-14	6,5	0,20	±	0,01	c	0,70	±	0,01	f	1,00	±	0,01	d
CHA0	6,5	0,20	±	0,06	c	1,0	±	0,01	c	1,60	±	0,01	b
BA4-19	6,5	0,30	±	0,02	bc	1,0	±	0	c	2,00	±	0	a
PM3-14	8,0	0,50	±	0,03	b	0,60	±	0,02	g	1,90	±	0,02	a
CHA0	8,0	0,20	±	0,06	c	0,80	±	0	e	1,50	±	0	c
BA4-19	8,0	0,50	±	0,02	b	0,80	±	0	d	2,00	±	0	a
p (Cepas)		0,0207				<0,0001				<0,0001			
p (pH)		<0,0001				<0,0001				<0,0001			
p (Interacción)		0,0347				<0,0001				<0,0001			

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

Tabla 5

Interacción de rizobacterias y pH sobre la densidad óptica

Cepas	pH	pH (horas)											
		24				48				72			
PM3-14	5,0	6,9	±	0,14	f	7,0	±	0,01	f	7,0	±	0,01	g
CHA0	5,0	7,0	±	0,07	e	7,0	±	0,01	e	7,0	±	0,01	f
BA4-19	5,0	6,6	±	0,13	i	6,7	±	0	i	6,8	±	0,01	i
PM3-14	6,5	6,8	±	0,01	g	6,8	±	0,01	h	7,0	±	0,01	h
CHA0	6,5	7,0	±	0,06	d	7,1	±	0,01	d	7,3	±	0,01	d
BA4-19	6,5	6,7	±	0,02	h	6,9	±	0	g	7,2	±	0,01	e
PM3-14	8,0	7,4	±	0,03	b	7,5	±	0,02	c	7,8	±	0	a
CHA0	8,0	7,7	±	0,06	a	7,7	±	0	a	7,7	±	0,01	c
BA4-19	8,0	7,3	±	0,02	c	7,5	±	0	b	7,7	±	0,01	b
Cepas		<0,0001				<0,0001				<0,0001			
Dosis		<0,0001				<0,0001				<0,0001			
Interacción		<0,0001				<0,0001				<0,0001			

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

Las bacterias PM 3-14, BA 4-19 y CHA0 son conocidas por su versátil ruta metabólica, que les permite sobrevivir en ambientes contaminados y ajustar el pH mediante la producción de metabolitos diversos. La respiración y fermentación bacteriana, que involucran la transformación de compuestos orgánicos, también pueden variar el estado del pH en medios de cultivo contaminados con herbicidas. La inoculación de *Thermobifida cellulosilytica* TB100 degrada el lindano en condiciones de pH 7 y 8. Sin embargo, el pH ácido y alcalino disminuyó la eficiencia de las especies bacterianas (Usmani et al., 2021). El medio de cultivo envenenado con glifosato influye en una disminución gradual del pH 6,8 a 5,3 para *Bacillus tropicus* GP1 y de 7,5 a 5,3 para *Proteus mirabilis* GP2 desde el día 0 al día 30 (Ibrahim et al., 2023).

Efecto del pH sobre la UFC/mL de las rizobacterias

Se presentó significancia estadística en los factores en estudio y las interacciones ($p < 0,0001$) a las 48 y 72 h. Durante las primeras 24 h, PM3-14 con pH de 6,5 evidenció un mayor número de UFC/ml con $1,4E+07$. A las 48 y 72 h, la cepa CHA0 demostró una mayor cantidad de células viables con ($1,0E+08$ y $1,1E+09$), respectivamente (Tabla 6). Esto demuestra que las rizobacterias tienen la capacidad de desarrollar su mayor concentración celular en condiciones de pH ligeramente neutro.

Tabla 6

Interacción de rizobacterias y pH sobre la Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

Cepas	pH	UFC/ml (horas)					
		24		48		72	
PM3-14	5,0	4,60E+05	± 2,65E+04 f	8,80E+06	± 1,00E+05 cd	4,03E+07	± 2,08E+06 d
CHA0	5,0	2,33E+05	± 1,53E+04 f	7,63E+06	± 1,53E+05 de	1,17E+07	± 2,89E+05 e
BA4-19	5,0	3,60E+05	± 2,00E+04 f	5,67E+06	± 1,53E+05 e	9,50E+07	± 2,00E+06 c
PM3-14	6,5	1,40E+07	± 2,08E+05 a	1,45E+07	± 1,53E+05 b	1,53E+08	± 2,89E+06 b
CHA0	6,5	8,53E+06	± 6,51E+05 cd	1,04E+08	± 2,31E+06 a	1,09E+09	± 5,77E+06 a
BA4-19	6,5	7,53E+06	± 4,51E+05 e	1,33E+07	± 2,89E+05 b	1,39E+07	± 5,77E+04 e
PM3-14	8,0	9,53E+06	± 2,52E+05 b	1,04E+07	± 1,73E+05 c	1,10E+07	± 5,77E+04 e
CHA0	8,0	8,07E+06	± 1,15E+05 de	9,83E+06	± 4,04E+05 cd	1,06E+07	± 2,31E+05 e
BA4-19	8,0	9,20E+06	± 1,00E+05 bc	1,28E+07	± 2,89E+05 b	1,34E+07	± 1,73E+05 e
Cepas		0,0207		<0,0001		<0,0001	
Dosis		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
Interacción		0,0347		<0,0001		<0,0001	

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

Tabla 7

Efecto de las rizobacterias sobre la dosis de pendimentalina sobre las variables morfológicas del arroz

Cepas	Dosis de herbicida	Germinación (%)	Longitud de la radícula (cm)		Longitud del hipocótilo (cm)	Índice de vigor (IDV)	
CHA0	0 mg/kg	100 ± 0	6,8 ± 0,1	ab	1,4 ± 0,1	d	82,5 ± 0 bc
BA4-19	0 mg/kg	100 ± 0	6,3 ± 0,6	ab	2,2 ± 0,1	bc	85,0 ± 2,33 b
PM3-14	0 mg/kg	100 ± 0	7,0 ± 0	ab	2,0 ± 0	c	90,0 ± 0 b
CHA0	75 mg/kg	0 ± 0	0 ± 0	f	0 ± 0	g	0 ± 0 e
BA4-19	75 mg/kg	30 ± 0	1,2 ± 0,1	ef	0,6 ± 0,1	f	5,3 ± 0,75 e
PM3-14	75 mg/kg	10 ± 0	2,3 ± 0,1	cde	0,6 ± 0,1	f	2,9 ± 0,29 e
CHA0	150 mg/kg	10 ± 0	0,6 ± 0,1	f	0 ± 0	g	0,6 ± 0,08 e
BA4-19	150 mg/kg	0 ± 0	0 ± 0	f	0 ± 0	g	0 ± 0 e
PM3-14	150 mg/kg	10 ± 0	1,3 ± 0,2	def	0,6 ± 0,1	f	1,8 ± 0,36 e
Sin	0 mg/kg	100 ± 0	7,2 ± 0,8	a	3,1 ± 0,1	a	102,5 ± 2,5 a
Sin	75 mg/kg	0 ± 0	0 ± 0	f	0 ± 0	g	0 ± 0 e
Sin	150 mg/kg	0 ± 0	0 ± 0	f	0 ± 0	g	0 ± 0 e
p (cepas)			<0,0001		<0,0001		<0,0001
p (dosis de herbicida)			<0,0001		<0,0001		<0,0001
p (interacción)			<0,0001		<0,0001		<0,0001

Los valores con letras similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($p \leq 0,05$ por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Los valores de desviación estándar \pm corresponden a $n = 9$.

Inoculación de rizobacterias sobre la germinación de *Oryza sativa* L. en suelo contaminado con pendimentalina

El porcentaje de germinación se vio afectado con dosis creciente de herbicidas. Las cepas BA4-19, CHA0 y PM3-14 con dosis de 75 y 150 mg/kg de pendimentalina aumentaron la germinación en comparación al control. La longitud de la raíz presentó un incremento sin aplicación de herbicida y rizobacterias (7,2 cm), sin embargo, en presencia de herbicida, las rizobacterias PM3-14 con dosis de 75 mg/kg y 150 mg/kg disminuyó la toxicidad con (2,3 y 1,3 cm) en comparación al control (0 cm). Se evidencia una mayor longitud del hipocótilo e índice de vigor (IDV) en suelos sin contaminación y aplicación de rizobacterias (3,1 cm y 102,5). A pesar de la acción de la rizobacteria para reducir la contaminación de pendimentalina, no se presentó una mejoría en la longitud del hipocótilo e IDV (Tabla 7). La bacteria PM 3-14 ejerce interacciones simbióticas en los estadios tempranos de germinación de arroz en suelos contaminados con pendimentalina donde posee un efecto bioestimulador sobre el incremento de biomasa del sistema radicular. Estas bacterias generan protección a las semillas de arroz de los efectos tóxicos de los herbicidas al degradar los herbicidas presentes en el suelo y además liberan subproductos que son beneficiosos para el crecimiento de las plantas (Sowunmi et al., 2020).

Aplicaciones *in vitro* de *Arthrobacter* sp. AAC22 en semillas *Avena sativa* L. incrementa la longitud y mejora el índice de vigor a los 14 días post-incubación (Urseler et al., 2022). La inoculación con *Bacillus amyloliquefaciens* NRRU-TV11 ejerce un

aumento sobre la altura de la planta, la longitud de las raíces, la biomasa y el índice de vigor de las plántulas de arroz en comparación con los controles no inoculados en suelos contaminados con clorpirifos (Saengsanga & Phakratok, 2023).

CONCLUSIONES

Las PGPR pueden tolerar 150 mg/L, presentando un mayor crecimiento celular en comparación a las demás dosis de pendimetalina. Se evidenció que las rizobacterias pueden reducir o aumentar su pH en dependencia de la condición que se encuentre, además la presencia de UFC/mL incrementa cuando existe un pH neutro. Las rizobacterias reduce levemente la toxicidad en germinación y

crecimiento de arroz, sin dosis de pendimetalina mejora la germinación y las características morfológicas de las plantas. Es posible que las rizobacterias tengan un efecto especial, el estudio de bioprospección y diferentes condiciones abiótica a nivel de vivero podría ser una alternativa para seguir con futuros estudios sobre la descontaminación de la pendimetalina.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) y la Universidad Estatal de Quevedo (UTEQ) por

permitir el desarrollo del trabajo de investigación. Al MSc. Antonio Mendoza por su colaboración dentro del trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appleby, A. P., & Valverde, B. E. (1989). Behavior of dinitroaniline herbicides in plants. *Weed Technology*, 3(1), 198-206.
- Avarseji, Z., Talie, F., Gholama Alipour Alamdari, E., & Hoseini Tilan, M. S. (2021). Investigation of the biodegradability of pendimethalin by *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia coli*. *Advances in Environmental Technology*, 7(4), 221-229. <https://doi.org/10.22104/AET.2021.5115.1399>
- Baxter, J., & Cummings, S. P. (2008). The degradation of the herbicide bromoxynil and its impact on bacterial diversity in a top soil. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1605-1616. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03709.x>
- Doolotkeldieva, T., Konurbaeva, M., & Bobusheva, S. (2018). Microbial communities in pesticide-contaminated soils in Kyrgyzstan and bioremediation possibilities. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(32), 31848-31862. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0048-5>
- Guerrero Ramírez, J. R., Ibarra Muñoz, L. A., Balagurusamy, N., Frías Ramírez, J. E., Alfaro Hernández, L., & Carrillo Campos, J. (2023). Microbiology and Biochemistry of Pesticides Biodegradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15969. <https://doi.org/10.3390/ijms242115969>
- Han, Y., Tang, Z., Bao, H., Wu, D., Deng, X., Guo, G., & Dai, B. (2019). Degradation of pendimethalin by the yeast YC2 and determination of its two main metabolites. *RSC advances*, 9(1), 491-497. <https://doi.org/10.1039/c8ra07872f>
- Hkudaygulov, G., Chetverikova, D., Bakaeva, M., Kenjiev, A., & Chetverikov, S. (2022). Plant growth promoting Rhizobacteria strain role in protecting crops sensitive to sulfonylurea herbicides from stress. *Journal of Crop Protection*, 11(4), 525-534.
- Ibrahim, N. E., Sevakumaran, V., & Ariffin, F. (2023). Preliminary study on glyphosate-degrading bacteria isolated from agricultural soil. *Environmental Advances*, 12, 100368. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100368>
- Juraeva, R. N., Zaynitdinova, L. I., Tashpulatov, J. J., Turaeva, N. A., & Lazutin, N. A. (2023). Influence of the herbicide pendimethalin on the population of microorganisms and the biological activity of soils. *Science and innovation*, 2(Special Issue 8), 1053-1058.
- Kulshrestha, G., Singh, S. B., Lal, S. P., & Yaduraju, N. T. (2000). Effect of long-term field application of pendimethalin: enhanced degradation in soil. *Pest Management Science*, 56(2), 202-206.
- Le Du-Carrée, J., Cabon, J., Morin, T., & Danion, M. (2021). Immunological and metabolic effects of acute sublethal exposure to glyphosate or glyphosate-based herbicides on juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Science of The Total Environment*, 784, 147162. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147162>
- Lei, Q., Zhong, J., Chen, S. F., Wu, S., Huang, Y., Guo, P., & Chen, S. (2023). Microbial degradation as a powerful weapon in the removal of sulfonylurea herbicides. *Environmental Research*, 235, 116570. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116570>
- Li, J., Zhang, W., Lin, Z., Huang, Y., Bhatt, P., & Chen, S. (2021). Emerging strategies for the bioremediation of the phenylurea herbicide diuron. *Frontiers in Microbiology*, 12, 686509. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.686509>
- Malviya, B. J., Jadeja, V. J., Sherathiya, H. M., Parakhia, M. V., Tomar, R. S., Vaja, M. B., & Sherathia, D. N. (2015). Bioremediation of glyphosate by bacteria isolated from glyphosate contaminated soil. *J. Pure. Appl. Microbiol*, 9(4), 3315-3320.
- Navarro, J. R. (1991). Efecto de la solarización del suelo sobre la población de malezas y del hongo *Rhizoctonia solani* durante la estación lluviosa en Alajuela, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 15.
- Neamat-Allah, A. N., Mahsoub, Y. H., & Mahmoud, E. A. (2021). The potential benefits of dietary β -glucan against growth retardation, immunosuppression, oxidative stress and expression of related genes and susceptibility to *Aeromonas hydrophila* challenge in *Oreochromis niloticus* induced by herbicide pendimethalin. *Aquaculture Research*, 52(2), 518-528. <https://doi.org/10.1111/are.14910>

- Oleńska, E., Małek, W., Wójcik, M., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2020). Características beneficiosas de las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas para mejorar el crecimiento y la salud de las plantas en condiciones difíciles: una revisión metódica. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 743, 140682.
- Onwuchekwa-Henry, C. B., Van Ogtrop, F., Roche, R., & Tan, D. K. (2023). Evaluation of pre-emergence herbicides for weed management and rice yield in direct-seeded rice in Cambodian lowland ecosystems. *Farming System*, 1(2). <https://doi.org/10.1016/j.farsys.2023.100018>
- Qiao, L., Yuan, N., Han, G., Cheng, B., Zhang, D., Song, J., & Mu, Y. (2021). Determination of pendimethalin dynamic residual distribution in crucian carp tissues and associated risk assessment. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/9984230>
- Saengsanga, T., & Phakratok, N. (2023). Biodegradation of chlorpyrifos by soil bacteria and their effects on growth of rice seedlings under pesticide-contaminated soil. *Plant, Soil & Environment*, 69(5). <https://doi.org/10.17221/106/2023-PSE>
- Singh, B., & Singh, K. (2016). Microbial degradation of herbicides. *Critical reviews in microbiology*, 42(2), 245-261. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564>
- Singh, R., & Singh, G. (2020). Effect of pendimethalin and imazethapyr on the development of microorganisms in vitro and at field conditions. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 102(9), 439-454. <https://doi.org/10.1080/02772248.2020.1815203>
- Sowunmi, K., Shoga, S. M., Adewunmi, O. M., Oriyomi, A. F., & Sowunmi, L. (2020). Isolation and molecular characterization of pesticide degrading bacteria in polluted soil. *bioRxiv*, 2020, 7. <https://doi.org/10.1101/2020.07.21.213942>
- Trivedi, N., & Dubey, A. (2021). Degradation studies of pendimethalin by indigenous soil bacterium *Pseudomonas* strain PD1 using spectrophotometric scanning and FTIR. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4499-4507. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02439-8>
- Urseler, N., Bachetti, R., Morgante, V., Agostini, E., & Morgante, C. (2022). Atrazine behavior in an agricultural soil: adsorption-desorption, leaching, and bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain AAC22. *Journal of Soils and Sediments*, 22, 93-108.
- Usmani, Z., Kulp, M., & Lukk, T. (2021). Bioremediation of lindane contaminated soil: Exploring the potential of actinobacterial strains. *Chemosphere*, 278, 130468. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130468>
- Vera Ojeda, P. A., Franco Ibars, R. A., Santacruz Oviedo, V. R., Salas Mayeregger, J., & Ruiz Samudio, F. P. (2023). Effect of pre-emergent herbicides applied by drip irrigation in the transplanted onion crop. *Investig. Agrar*, 25(1). <https://doi.org/10.18004/investig.agrar.2023.junio.2501692>