

EFFECTO HERBICIDA EN PRE Y POST-EMERGENCIA DE MICROPARTÍCULAS CARGADAS CON AUXINAS DE ORIGEN BACTERIANO

PRE- AND POST-EMERGENCE HERBICIDAL EFFECT OF MICROPARTICLES LOADED WITH AUXINS OF BACTERIAL ORIGIN

RESUMEN

El uso desmedido de herbicidas sintéticos ha generado grandes impactos ambientales, como la aparición de malezas resistentes, la contaminación de acuíferos y los riesgos para la salud humana. Ante este escenario, los bioherbicidas derivados de procesos biotecnológicos constituyen una alternativa viable para fomentar prácticas agrícolas sustentables. En este estudio se evaluó, en condiciones de campo, el efecto herbicida de micropartículas cargadas con ácido indol-3-acético (IAA) producido por *Bacillus licheniformis*. Se compararon tratamientos con extracto libre de células (no encapsulado), micropartículas cargadas (encapsuladas), micropartículas vacías y controles (agua y 2,4-D). El diseño experimental consistió en un campo de 15 m², dividido en 15 parcelas de 1 m², bajo un diseño de bloques completamente al azar, con tres réplicas por tratamiento. Las variables evaluadas incluyeron la germinación, la densidad, la cobertura, la frecuencia, la altura de las malezas y el contenido de clorofila. Los resultados mostraron una eficiencia de encapsulación del 76 % y una producción microbiana de 99 mg/L de IAA. En la evaluación pre-emergente, el tratamiento con micropartículas cargadas inhibió hasta un 20 % la germinación de semillas y redujo significativamente la densidad de malezas, superando al tratamiento con extracto no encapsulado (<10 % de inhibición). Además, las plántulas emergidas bajo este tratamiento presentaron una mayor altura, lo que sugiere un desequilibrio hormonal. En la evaluación post-emergente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en altura ni en contenido de clorofila respecto al control; sin embargo, se registraron síntomas visuales de fitotoxicidad (clorosis y decaimiento) en malezas de hoja ancha, estimándose un control del 30 % a los 7 días posteriores a la aplicación. Estos hallazgos indican que la microencapsulación protege y potencia el efecto fitotóxico del IAA, lo que constituye una estrategia prometedora para su aplicación en campo. Se discute el mecanismo de

Ciencia, Tecnología y
Biología

Víctor Eduardo Navarro-Macías ¹, Olga B. Álvarez-Pérez ², Mayela Govea-Salas ¹, Elan Iñaky Laredo-Alcalá ³, Ainara Castillo-Manzanares ¹, Anna Ilina¹, Roberto Arredondo-Valdés ¹

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, 25280 Saltillo, Coahuila, México

² Microbiological Research and Development Department, Greencorp Biorganiks de México S.A. de C.V.

³ Centro de Investigación para la Conservación de la Biodiversidad y Ecología de Coahuila (CICBEC), Universidad Autónoma de Coahuila, 25280 Saltillo, Coahuila, México.

Correspondencia:
Roberto Arredondo-Valdés, Correo: arredondo@uadec.edu.mx, ORCID: 0000-0003-4093-0707



CienciaAcierta

acción mediante el desequilibrio hormonal (supresión de giberelinas, aumento de ácido abscísico y etileno) y el estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno. Aunque el efecto no es igual al de los herbicidas sintéticos convencionales, la formulación representa un avance hacia bioherbicidas estables y de liberación controlada.

Palabras clave: bioherbicida; ácido indol-3-acético; *B. licheniformis*; microencapsulación; control de maleza.

ABSTRACT

*The intensive use of synthetic herbicides has led to severe environmental impacts, including the emergence of herbicide-resistant weeds, groundwater contamination, and human health risks. In this context, bioherbicides derived from biotechnological processes represent a viable alternative to promote sustainable agricultural practices. This study evaluated the herbicidal effect of microparticles loaded with indole-3-acetic acid (IAA) produced by *Bacillus licheniformis* under field conditions. Treatments included cell-free extract (unencapsulated), loaded microparticles (encapsulated), empty microparticles, and controls (water and 2,4-D). The experimental design consisted of a 15 m² field divided into 15 plots of 1 m², arranged in a randomized complete block design with three replicates per treatment. Evaluated variables included seed germination, weed density, cover, frequency, weed height, and chlorophyll content. Results showed an encapsulation efficiency of 76 % and a microbial IAA yield of 99 mg/L. In the pre-emergence assay, the loaded microparticle treatment inhibited seed germination by up to 20% and significantly reduced weed density, outperforming the unencapsulated extract (<10% inhibition). Notably, seedlings that emerged under this treatment exhibited greater height, suggesting a hormonal imbalance. In the post-emergence assay, no statistically significant differences in height or chlorophyll content were observed compared to the control; however, visible phytotoxicity symptoms (chlorosis and wilting) were observed in broadleaf weeds, with an estimated 30% weed control at 7 days post-application. These findings indicate that microencapsulation protects and enhances the phytotoxic effect of IAA, offering a promising strategy for its field application. The mode of action is discussed in terms of hormonal imbalance (suppression of gibberellins, increase in abscisic acid and ethylene) and oxidative stress*



induced by reactive oxygen species. Although the effect does not match that of conventional synthetic herbicides, this formulation represents progress toward stable, controlled-release bioherbicides.

Keywords: bioherbicide; indole-3-acetic acid; *B. licheniformis*; microencapsulation; weed control.

INTRODUCCIÓN

Las malezas son plantas que crecen de manera silvestre, estas son consideradas indeseables debido a los efectos negativos que causan, en los cultivos estas suelen afectar la calidad y el rendimiento; reduciéndolo de 5 hasta 40 % lo que representa grandes pérdidas económicas (Breeÿen & Charudattan, 2009), a través del tiempo se han utilizado distintos métodos, sin embargo, el uso de herbicidas sintéticos ha sido el más eficaz para combatir a las malezas lamentablemente, el uso desmedido ha generado diversos problemas ambientales tales como; malezas resistentes a herbicidas, contaminación de mantos acuíferos, alta residualidad en suelos y daños a la salud humana. Debido a esto, la búsqueda de nuevos herbicidas menos tóxicos resulta fundamental para el desarrollo de una agricultura sustentable. En este sentido, la formulación de herbicidas a base de compuestos de origen natural podría ser una alternativa para reducir el uso de herbicidas sintéticos (Kremer, 2023; Kumar y col., 2018). Los herbicidas de origen biológico o bioherbicidas pueden obtenerse a partir de metabolitos de plantas o microorganismos; estos últimos ofrecen la ventaja de que pueden producirse en laboratorio y a gran escala (Mupondwa y col., 2015). Aunque los microorganismos más reportados para la formulación de herbicidas son los hongos fitopatógenos tales como: *Fusarium*, *Phoma* y *Colletotrichum*, existen bacterias como *Bacillus* que poseen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos (enzimas, cianuro de hidrógeno, ácido indolacético (IAA), amoníaco, disulfuro de dimetilo, ácido cianhídrico y compuestos volátiles tóxicos) los cuales a condiciones ideales pueden tener efecto fitotóxico (Radhakrishnan y col., 2018; Shahid y col., 2021). El IAA es una hormona vegetal, responsable de la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Ratnaningsih y col., 2023) y se ha usado como modelo para la formulación de herbicidas sintéticos (herbicidas auxínicos). Sin embargo existen pocos reportes del uso de auxinas naturales como agentes



herbicidas, principalmente por su inestabilidad química en el medio ambiente y dificultad para controlar su liberación y sitio de acción, por lo cual uso de tecnologías que permitan mantener estables estas moléculas es de gran importancia, la micro encapsulación resulta una solución ya que en la matriz adecuada es posible proteger a las auxinas, mejorar la estabilidad y controlar la liberación en condiciones específicas de suelo y medio ambiente (Bhatia, 2020).

En el presente estudio se evaluó, en campo, la actividad herbicida de microcápsulas cargadas con auxinas producidas por *B. licheniformis*, analizando su impacto en la germinación y el crecimiento de malezas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de auxinas

La producción de los metabolitos se llevó a cabo mediante fermentaciones en estado líquido utilizando un *Bacillus licheniformis*. Se trabajó en matraces de 500 mL con el 10 % del volumen de medio LB adicionado con triptófano (Peptona de caseína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L y triptófano 3 g/L) las condiciones de fermentación utilizadas fueron: 150 rpm, pH 7, y 35 °C por 24 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos y se pasaron por un filtro de 0,22 µm para obtener el sobrenadante libre de células, destinado a su aplicación posterior.

Cuantificación de auxinas

La concentración de IAA se determinó mediante un método colorimétrico con el reactivo de Salkowski (Anguiano-Cabello y col., 2017), utilizando ácido indol-3-acético como estándar. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 530 nm.

Síntesis de micropartículas

La encapsulación se realizó utilizando una matriz polimérica compuesta por alginato de sodio (0,063 %, pH 4,9) y quitosano (0,07 %, pH 4,6), en presencia de iones de calcio como agente gelificante. Para preparar la solución de quitosano, se disolvió el quitosano en ácido acético al 1 % bajo agitación constante (700 rpm) a temperatura ambiente. A continuación, se filtró la solución y se ajustó el pH a 4,5. Al mismo tiempo, se preparó la solución de alginato de sodio a temperatura ambiente y se ajustó su pH a 4,9. A continuación, se mezclaron 59 ml de la solución de alginato con 12,5 ml de la solución de quitosano, manteniendo la agitación mecánica a 450 rpm durante 1 hora para favorecer la interacción entre los polímeros.



De la mezcla resultante se tomaron 20 ml y se añadieron 5 ml del extracto libre de células obtenido tras la fermentación. Las microcápsulas se formaron mediante goteo controlado con una bomba peristáltica que operaba a un caudal de 20 ml/h, depositando la mezcla en una solución de cloruro cálcico al 2,5 % a temperatura ambiente, donde se produjeron la gelificación iónica y la formación de las cápsulas. (Pacios-Michelena y col., 2020).

Evaluación de Herbicidas en el Campo

Evaluación de herbicidas preemergentes

Este experimento se llevó a cabo en la localidad de Congregación Cañada Ancha, en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila, con coordenadas 25°32'27.6 N 101°01'15.8»O. El área experimental fue de 15 m² y previamente se limpió, aró y niveló. Se trabajó con el banco de semillas existente en el terreno, sin realizar siembra adicional. El terreno se dividió en 15 cuadrantes de 1 m² distribuidos según un diseño de bloques completamente aleatorio. Se evaluaron cinco tratamientos, cada uno con tres réplicas: extracto de auxina encapsulado, extracto de auxina no encapsulado, encapsulado sin extracto, un control con agua y un control químico (2,4-D), que se aplicaron con un pulverizador manual (Tango Osatu 1.5). Las variables de respuesta consideradas fueron: cobertura de malezas, frecuencia de malezas, densidad de malezas, porcentaje de germinación y altura de las malezas, las cuales se midieron 7 días después.

Evaluación de herbicidas postemergentes

La evaluación postemergente se llevó a cabo en el mismo lugar que la preemergente. Del mismo modo, el área experimental fue de 15 m²; previamente se limpió, aró y niveló, y luego se dividió en 15 cuadrantes de 1 m². Una vez que las malas hierbas del banco de campo alcanzaron una altura de entre 10 y 15 cm, se aplicaron los siguientes tratamientos: extracto de auxina encapsulado, extracto de auxina no encapsulado, encapsulado sin extracto, un control con agua y un control químico (2,4-D), mediante un pulverizador manual (Tango Osatu 1.5). Las variables de respuesta fueron la altura de las malas hierbas y el contenido de clorofila. Además, se consideró la escala del Consejo Europeo de Malas Hierbas.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las variables de respuesta se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño de bloques aleatorios. Además, se realizó la comparación de medias de Tukey ($p \leq 0,05$) para identificar los tratamientos que eran estadísticamente diferentes entre sí.



RESULTADOS

Producción de auxinas y microencapsulación

En las condiciones de fermentación establecidas, se logró una producción de 99 mg/L de auxinas. Posteriormente, los metabolitos obtenidos se sometieron a un proceso de encapsulación, con una eficiencia del 76 %. A partir de este rendimiento, se formuló el tratamiento correspondiente de micropartículas cargadas, ajustando la concentración final para obtener un equivalente de 100 mg/L de auxinas encapsuladas.

Evaluación de herbicidas preemergentes

En el área experimental se trabajó con el banco de semillas nativas. Crecieron un total de cuatro especies de plantas silvestres (Tabla 1), de las cuales se identificaron las siguientes: *Viguiera linearis* (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl., *Solanum elaeagnifolium* Cav. y *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen. La cuarta planta era una maleza de hoja ancha que aún no se había identificado. La maleza con mayor frecuencia relativa y cobertura media fue *Solanum elaeagnifolium* Cav., ya que se encontró en prácticamente todos los cuadrantes, seguida de la maleza de hoja ancha. En cuanto a la densidad de malezas, el tratamiento con micropartículas cargadas con auxinas mostró una densidad menor que la del tratamiento con el extracto no encapsulado.

El tratamiento con el mayor porcentaje de inhibición fue el del extracto encapsulado al 20 %. Este tratamiento fue 50 % menos eficaz que el control químico.

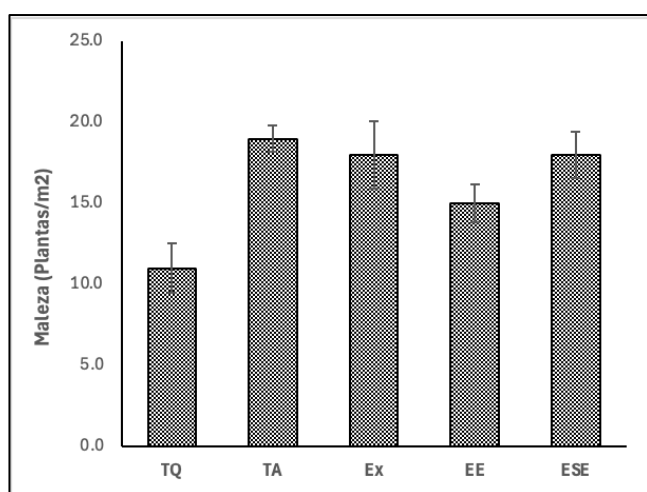


Figura 1. Densidad de malezas: Número de malezas por m²: TQ - control químico, TA - control negativo, Ex - extracto sin encapsula EE - micropartículas cargadas con auxinas ESE - Micropartículas sin carga

El extracto no encapsulado (Ex) y las microcápsulas sin carga (ESE) inhibieron menos del 10 % de la germinación de las semillas (Figura 1). Sin embargo, la altura de las plántulas que lograron emerger mejoró con el extracto encapsulado, superando incluso la del control negativo (agua) en 16 cm y 12 cm, respectivamente (Figura 2). El número de plantas por m² confirma el efecto de los tratamientos sobre la germinación de las semillas, ya que la zona con el tratamiento EE presentó la menor densidad de plantas (Figura 1).

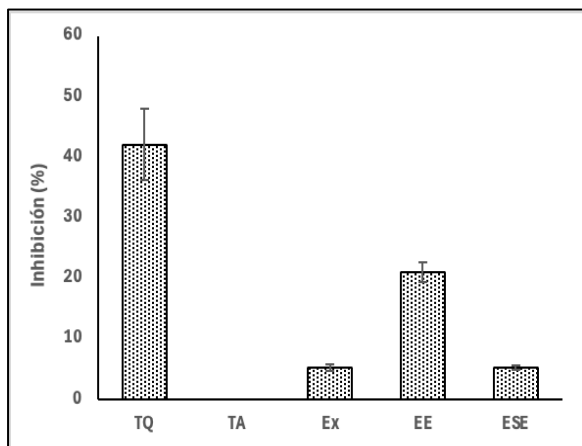


Figura 2. Efecto de los tratamientos sobre: *arriba*, - la inhibición de la germinación (%) y *abajo*, - la altura de malezas (cm). TQ - control químico, TA - control negativo, Ex - extracto sin encapsula EE - micropartículas cargadas con auxinas ESE.

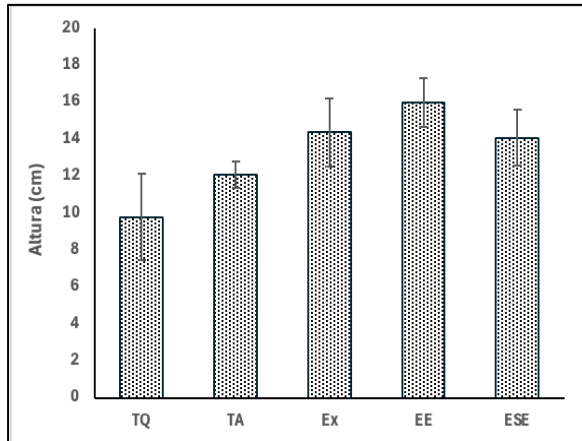


Tabla 1. Malezas presentes en el área evaluada: TQ - control químico, TA - control negativo, Ex – extracto sin encapsula EE – micropartículas cargadas con auxinas ESE – micropartículas sin carga

Tratamiento	Especie	Cobertura promedio (%)	Frecuencia Relativa (%)
TQ	<i>Viguiera linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl.	3.7	33.3
	Broadleaf weed	3.7	33.3
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	1.8	33.3
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	30.3	100.0
TA	<i>Viguiera linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl.	7.3	66.7
	<i>Setaria parviflora</i> (Poir.) Kerguélen	5.7	33.3
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	19.3	66.7
Ex	<i>Viguiera linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl.	1.0	33.3
	<i>Setaria parviflora</i> (Poir.) Kerguélen	3.7	33.3
	Broadleaf weed	2.0	33.3
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	22.0	66.7
EE	<i>Viguiera linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl.	3.3	100.0
	Broadleaf weed	3.0	66.7
	<i>Solanum elaeagnifolium</i> Cav.	14.3	100.0
ESE	<i>Viguiera linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. ex Hemsl.	15.7	66.7
	Broadleaf weed	5.3	33.3

Evaluación de herbicidas postemergentes

Los tratamientos evaluados no mostraron un efecto significativo sobre la altura de las malezas ni sobre el contenido de clorofila en comparación con el control negativo (Figura 3). Sin embargo, en las malezas tratadas con los extractos encapsulados y sin encapsular se observaron malezas con ligeros daños y síntomas como clorosis y decaimiento, principalmente en las malezas de hoja ancha. De acuerdo con los síntomas de daño observados, podemos decir que el tratamiento de IAA encapsulado tuvo un control de maleza de 30 % a los 7 días de evaluación.

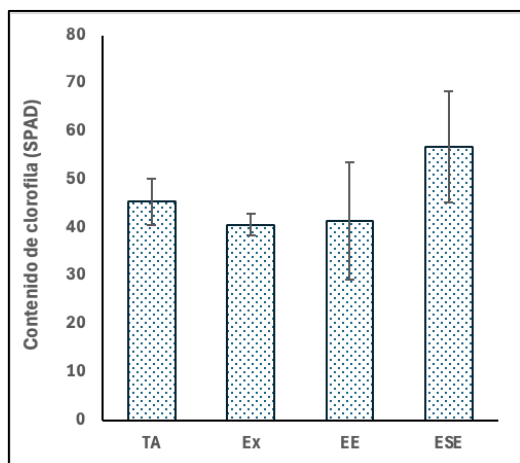
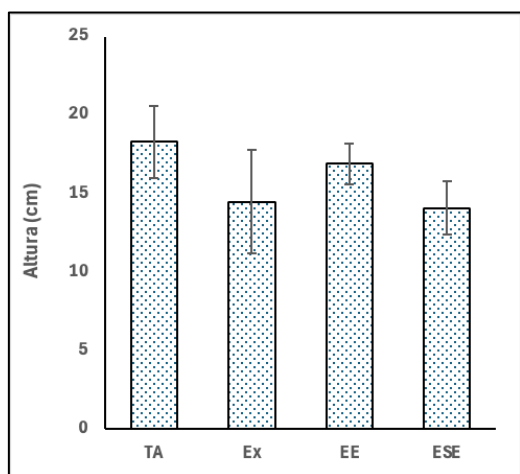


Figura 3. Efecto de los tratamientos sobre las malezas en condiciones de campo: *arriba*, - altura; *abajo*, contenido de clorofila: TA - control negativo, Ex - extracto sin encapsula EE - micropartículas cargadas con auxinas ESE - micropartículas sin carga

DISCUSIÓN

Las auxinas forman parte de un grupo de fitohormonas involucradas en la regulación del crecimiento de las plantas actuando de manera directa o indirectamente los procesos fisiológicos de estas, a concentraciones en equilibrio permiten un buen desarrollo de las plantas, sin embargo cuando se encuentran en exceso, las auxinas pueden tener efecto fitotóxico (Ratnaningsih y col., 2023), durante el procesos de germinación las fitohormonas mayormente involucradas son las giberelinas y el ácido abscísico, estas participan en la activación de la síntesis de enzimas que darán paso a la germinación y en la dormancia respectivamente (Zhao y col., 2020), cuando hay auxinas en exceso se genera un desequilibrio hormonal esto genera una reducción de la acción de las giberelinas e incrementar la concentración de ácido abscísico provocando un retraso en la germinación de semillas (Rai y col., 2021).

En plántulas, las auxinas pueden actuar mediante distintos mecanismos (Zia Ul Haq y col., 2020). Menciona que las auxinas endógenas promueven la formación de ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico; este es un precursor del etileno, la hormona encargada de la senescencia de las plantas. Por otro lado (Grossmann, 2010) menciona que altas dosis de AIA exógeno incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando peroxidación de lípidos, daño en membranas y reducción del contenido de clorofila.

CONCLUSIÓN

La microencapsulación de auxinas producidas por *B. licheniformis* incrementa significativamente su efectividad como herbicida pre-emergente, reduciendo la germinación y densidad de malezas mediante un mecanismo hormonal y oxidativo. Aunque el efecto post-emergente fue parcial, los síntomas fitotóxicos observados confirmaron actividad biológica. Este trabajo demuestra la viabilidad técnica de estabilizar metabolitos microbianos mediante encapsulación para su uso en campo, sentando las bases para optimizar dosis, combinaciones con otros metabolitos y escalado piloto. Se recomienda evaluar formulaciones con liberación retardada y ensayos en cultivos específicos para determinar selectividad.



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Apoyo para la Consolidación de Clústeres Académicos (CABS) de la Universidad Autónoma de Coahuila y a la Secretaría de Ciencia, Humanidad, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo institucional. También al CICBEC-UAdeC por las facilidades logísticas durante las pruebas de campo.

REFERENCIAS

- Anguiano-Cabello, J. C., Flores-Olivas, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., Arredondo-Valdés, R., & Olalde-Portugal, V. (2017). Fast Detection of Auxins by Microplate Technique. *American Journal of Plant Sciences*, 08(02): 171–177. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.82013>
- Bhatia, M. (2020). A review on application of encapsulation in agricultural processes. In *Encapsulation of Active Molecules and Their Delivery System* (pp. 131–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819363-1.00008-9>
- Breeÿen, A. D., & Charudattan, R. (2009). Biological Control of Invasive Weeds in Forests and Natural Areas by Using Microbial Agents. In Inderjit (Ed.), *Management of Invasive Weeds* (Vol. 5, pp. 189–209). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9202-2_10
- Grossmann, K. (2010). Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, 66(2): 113–120. <https://doi.org/10.1002/ps.1860>
- Kremer, R. J. (2023). Bioherbicide development and commercialization. In *Development and Commercialization of Biopesticides* (pp. 119–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95290-3.00016-9>
- Kumar, V., Aggarwal, N. K., & Malik, A. (2018). Bioherbicidal Concept: A Novel Strategy to Control Weeds. In J. Singh, D. Sharma, G. Kumar, & N. R. Sharma (Eds), *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development* (pp. 29–40). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0053-0_2
- Mupondwa, E., Li, X., Boyetchko, S., Hynes, R., & Geissler, J. (2015). Technoeconomic analysis of large scale production of pre-emergent *Pseudomonas fluorescens* microbial bioherbicide in Canada. *Bioresource Technology*, 175: 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.130>



- Radhakrishnan, R., Alqarawi, A. A., & Abd_Allah, E. F. (2018). Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158: 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.018>
- Rai, N., Kumar, V., Sharma, M., & Akhter, Y. (2021). Auxin transport mechanism of membrane transporter encoded by AEC gene of *Bacillus licheniformis* isolated from metagenome of Tapta Kund Hotspring of Uttarakhand, India. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185: 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.097>
- Ratnaningsih, H. R., Noviana, Z., Dewi, T. K., Loekito, S., Wiyono, S., Gafur, A., & Antonius, S. (2023). IAA and ACC deaminase producing-bacteria isolated from the rhizosphere of pineapple plants grown under different abiotic and biotic stresses. *Heliyon*, 9(6): e16306. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16306>
- Shahid, I., Han, J., Hanooq, S., Malik, K. A., Borchers, C. H., & Mehnaz, S. (2021). Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. And Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 605195. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.605195>
- Zhao, T., Deng, X., Xiao, Q., Han, Y., Zhu, S., & Chen, J. (2020). IAA priming improves the germination and seedling growth in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via regulating the endogenous phytohormones and enhancing the sucrose metabolism. *Industrial Crops and Products*, 155: 112788. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112788>
- Zia Ul Haq, M., Zhang, Z., Wei, J., & Qiang, S. (2020). Ethylene Biosynthesis Inhibition Combined with Cyanide Degradation Confer Resistance to Quinclorac in *Echinochloa crus-galli* var. *Mitis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5): 1573. <https://doi.org/10.3390/ijms21051573>