



## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / RESEARCH ARTICLE

EFECTO DEL GLIFOSATO SOBRE LA  
MICROBIOTA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA  
EN RIZÓSFERA DE PLANTAS RIPARIASEffect of Glyphosate on Microbiota and Enzymatic  
Activity in Rhizosphere of Riparian Plants

Mariana Y. LÓPEZ-CHÁVEZ<sup>1a\*</sup>, Dulce INFANTE-MATA<sup>1b</sup>, Teresa ÁLVAREZ-LEGORRETA<sup>2c</sup>, Michael F. DUNN<sup>3d</sup>, Karina GUILLÉN-NAVARRO<sup>1e</sup>

<sup>1</sup> El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2.5, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, México.

<sup>2</sup> El Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario Km 5.5, C.P. 77014, Chetumal, Quintana Roo, México.

<sup>3</sup> Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida Universidad s/n, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>a</sup> [mchavez@ecosur.edu.mx](mailto:mchavez@ecosur.edu.mx)

<sup>b</sup> [dinfante@ecosur.mx](mailto:dinfante@ecosur.mx)

<sup>c</sup> [teral@ecosur.mx](mailto:teral@ecosur.mx)

<sup>d</sup> [mike@ccg.unam.mx](mailto:mike@ccg.unam.mx)

<sup>e</sup> [kguillen@ecosur.mx](mailto:kguillen@ecosur.mx)

\* Correspondencia: [mchavez@ecosur.edu.mx](mailto:mchavez@ecosur.edu.mx)

**Recibido:** 18 de mayo de 2023. **Revisado:** 15 de agosto de 2023. **Aceptado:** 05 de septiembre de 2023.

**Editor asociado:** Xavier Marquinez

**Citation/ citar este artículo como:** López-Chávez, M.Y., Infante-Mata, D., Álvarez-Legorreta, T., Dunn, M.F. y Guillén-Navarro, K. (2024). Efecto del glifosato sobre la microbiota y la actividad enzimática en rizósfera de plantas riparias. *Acta Biol Colomb*, 29(1), 119-128. <https://doi.org/10.15446/abc.v29n1.108336>

## RESUMEN

El glifosato es un herbicida foliar detectado en suelo, sedimento y agua, que ocasiona daños no visibles en organismos no blanco, pudiendo afectar la diversidad, estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas asociadas a la vegetación riparia que provee de servicios ecosistémicos. El objetivo del presente trabajo fue 1) determinar las cuentas viables de microorganismos y 2) analizar cómo se afectan las actividades enzimáticas asociadas al metabolismo del carbono, fósforo y nitrógeno en la rizósfera de plantas riparias (*Fimbristylis dichotoma*, *Ludwigia octovalvis* y *Typha domingensis*) expuestas a glifosato. Para mantener el micro-hábitat en la rizósfera, se colectaron plantas con el mismo suelo donde habitaban. A las plantas se les aplicó 50 mg de glifosato ácido equivalente (ae)/L a nivel de suelo, y se mantuvieron por 15 días. Después, a partir de muestras de rizósfera, se aislaron y cuantificaron actinomicetos, bacterias totales (incluyendo actinomicetos) y hongos, y se analizó la actividad de 19 enzimas relacionadas con el metabolismo de P, C y N. Por la presencia del herbicida, se encontró que fueron afectadas negativamente 1) las células bacterianas principalmente, en comparación con actinomicetos y hongos, y 2) las poblaciones microbianas aisladas de la rizósfera de *L. octovalvis* en comparación con *F. dichotoma* y *T. domingensis*. Las determinaciones de actividades enzimáticas mostraron que el metabolismo del fósforo y carbono fueron estimulados positivamente por el glifosato. La información obtenida permite identificar la respuesta de la diversidad microbiana cultivable y la diversidad funcional de rizósfera de plantas de importancia ecológica.

**Palabras clave:** Faena fuerte, humedales costeros, mesocosmos, sitio RAMSAR, Soconusco.

## ABSTRACT

Glyphosate is a foliar herbicide detected in soil, sediment, and water, causing non-visible damage to non-target organisms, potentially affecting the diversity, structure, and functioning of microbial communities associated with riparian vegetation that provide ecosystem services. The objective of the present work was 1) to determine the viable counts of microorganisms and 2) to analyze how the enzymatic activities associated with the metabolism of carbon, phosphorus, and nitrogen are affected in the riparian plants' rhizosphere (*Fimbristylis dichotoma*, *Ludwigia octovalvis*, and *Typha domingensis*) exposed to glyphosate. The plants were collected with the same soil in which they lived to maintain the micro-habitat of the rhizosphere. Zero or fifty mg of glyphosate acid equivalent (ae)/L was applied to the plants at the ground level for 15 days. Actinomycetes, total bacteria (including actinomycetes), and fungi were then isolated and quantified, and the activity of 19 enzymes (metabolism of P, C, and N) were analyzed from rhizosphere samples. In the presence of the herbicide, it was found that 1) bacteria was most negatively affected compared to actinomycetes and fungi, and 2) microbial populations isolated from *L. octovalvis* were lesser than those from *T. domingensis* and *F. dichotoma*. Rhizosphere enzymatic activities showed that phosphorus and carbon metabolism were stimulated by glyphosate. The information obtained from this work allows us to identify the response of cultivable microbial diversity and functional diversity of the rhizosphere of ecologically important plants.

**Keywords:** Faena fuerte, coastal wetlands, mesocosms, RAMSAR site, Soconusco.

## INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida que se aplica en las hojas de aquellas plantas que son consideradas malezas, pues compiten por nutrientes con las especies vegetales de interés comercial (Labrada y Parker 1996). Cuando las malezas son fumigadas, una proporción del compuesto entra dentro de los tejidos vegetales y otra proporción cae directamente al suelo donde suele ser retenido y degradado (Helander et al. 2012). Sin embargo, el glifosato que no queda retenido en el follaje ni en el suelo puede depositarse en los cuerpos de agua superficial ( $\leq 10$  mg/L), encontrándose en la columna de agua y sedimento de ríos, lagos, lagunas, estuarios y del mar; e inclusive en muestras de agua subterránea ( $\leq 18$   $\mu$ g/L) (Battaglin et al. 2014; Ruiz-Toledo et al. 2014; Zhang et al. 2016; Gunarathna et al. 2018). De esta manera, el glifosato puede afectar el crecimiento de la vegetación nativa no blanco que habita en ecosistemas de gran importancia ambiental como son las zonas riparias (Helander et al. 2012).

En el transporte del glifosato desde las zonas agrícolas hacia los cuerpos de agua superficiales, éste puede ser retenido en los ecosistemas riparios (Giaccio et al. 2016; Hénault-Ethier et al. 2017). En dicha región de transición entre los sistemas terrestres y acuáticos, existen plantas, como *Ludwigia peploides* H.B.K. y *Typha latifolia* L., que pueden acumular al glifosato dentro de sus tejidos (Pérez et al. 2017; Sesin et al. 2019). Cada especie vegetal tiene diferente potencial en la remoción del compuesto, por ejemplo, *Typha domingensis* Pers. puede contribuir en un 79 %, mientras que *Fimbristylis dichotoma* (L.) Vahl. en un 55 % (López-Chávez et al. 2021). Esto muestra uno de los servicios ambientales de las plantas riparias para ayudar a purificar el agua al remover el glifosato y otros contaminantes orgánicos provenientes de fuentes de contaminación no puntual (Dosskey et al. 2010).

Resulta interesante el estudio del microbioma de plantas de ecosistemas riparios debido que existen microorganismos cultivables de rizósfera que resisten al compuesto, pudiendo reducir la toxicidad a beneficio del huésped, y a su vez, ayudar en el crecimiento y salud vegetal (López-Chávez et al. 2021).

Actualmente, se conoce muy poco del efecto del glifosato en las comunidades microbianas cultivables y no cultivables de la rizósfera de plantas de ecosistemas riparios, con información contradictoria sobre los efectos del glifosato en dichas comunidades y en su diversidad funcional (Mijangos et al. 2009; Kremer y Means 2009; Schafer et al. 2014; Newman et al. 2016a). En la rizósfera de *Panicum maximum* Jacq., planta encontrada en ecosistemas riparios, se ha visto que el glifosato reduce las poblaciones de microorganismos cultivables (López-Chávez et al. 2021). En biotipos susceptibles o resistentes al glifosato de *Ambrosia trifida* L., otra planta riparia, el compuesto provoca perturbaciones en las comunidades microbianas y éstas son diferentes entre ambos grupos (Schafer et al. 2014). En plantas de interés comercial como maíz (*Zea mays* L.) y soya (*Glycine max* L.), la abundancia relativa de *Proteobacteria*, particularmente *gammaproteobacteria*, se incrementa con la exposición al glifosato; y en el caso de *Acidobacteria* su abundancia disminuye (Newman et al. 2016a). En lo referente a efectos por glifosato en las funciones metabólicas, en la rizósfera de maíz y soya expuestas al glifosato, se detecta una expresión reducida en los transcritos bacterianos implicados con el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos; caso contrario se observa en la expresión de los transcritos relacionados con la respiración y el metabolismo de proteínas (Newman et al. 2016b).

A pesar de que los ecosistemas riparios y los humedales naturales ofrecen múltiples servicios ecosistémicos, como retención de suelo, conservación de la biodiversidad, secuestro de carbono, purificación del agua, entre otros, existen pocos estudios referentes a cómo se ven afectados estos ecosistemas por las concentraciones bajas y aplicaciones repetidas de los contaminantes agrícolas. Es necesario desarrollar estudios que permitan conocer cómo las comunidades microbianas y las funciones metabólicas de las plantas de dichos sistemas pueden verse perjudicadas por este herbicida.

Dada la importancia de la bioconservación microbiana frente a las amenazas antrópicas tanto a nivel global como

local, los objetivos de este trabajo fueron 1) determinar las cuentas viables de microorganismos (actinomicetos, bacterias y hongos) y 2) analizar cómo se afectan las actividades enzimáticas asociadas al metabolismo de carbono, fósforo y nitrógeno en la rizósfera de especies vegetales riparias (*Fimbristylis dichotoma*, *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven y *Typha domingensis*) expuestas al glifosato. Nuestras hipótesis son a) la cantidad de actinomicetos, bacterias y hongos cultivables provenientes de la rizósfera de los tratamientos con glifosato puede verse afectada negativamente. b) En respuesta al contaminante, las plantas y los microorganismos pueden favorecer algunas actividades enzimáticas en la rizósfera para su sobrevivencia. Las plantas evaluadas en este estudio fueron seleccionadas de acuerdo con su abundancia en las zonas riparias (*L. octovalvis*) y su potencial en la remoción del contaminante (*F. dichotoma* y *T. domingensis*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de las plantas

Entre los sitios inundables contaminados con glifosato, reportados en la región Soconusco en el estado de Chiapas, México, por Ruiz-Toledo et al. (2014), se colectaron tres especies vegetales de los sitios RAMSAR y Zonas Sujetas a Conservación Ecológica: Cabildo-Amatal (14°80' N, y 92°50' W) y El Gancho-Murillo (14°61' N, y 92°31' W) en los municipios de Mazatán y Suchiate, respectivamente. De acuerdo con la abundancia de las plantas en los sitios de colecta, las especies seleccionadas fueron: *T. domingensis* (Typhaceae), *F. dichotoma* (Cyperaceae) y *L. octovalvis* (Onagraceae). De cada especie, se colectaron 18-25 individuos vivos. Así mismo, se colectaron muestras de suelo a una profundidad de 30 cm donde se encontraba creciendo cada planta colectada, esto para mantener las condiciones de la matriz de origen en los ensayos posteriores.

### Construcción de los mesocosmos

En total, se construyeron 18 unidades experimentales, seis contenedores para cada especie vegetal (Fig. 1). La unidad experimental consistió en recipientes de 12 L de capacidad, que contenían aproximadamente 5000 cm<sup>3</sup> de suelo colectado en los sitios de muestreo. En cada unidad experimental se transplantaron tres individuos de la misma especie. Los mesocosmos se mantuvieron en condiciones de inundación con dos litros de agua de pozo profundo. Las plantas se dejaron aclimatar en condiciones de sombra por siete días y con suficiente luz natural para asegurar su adecuado crecimiento y evitar entrada de agua de lluvia.

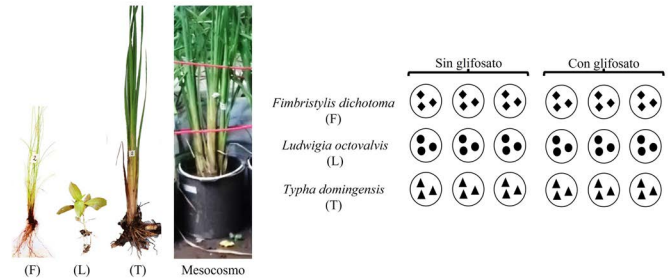


Fig. 1 Tratamientos experimentales.

### Tratamientos experimentales

Después del periodo de aclimatación, a tres unidades experimentales de cada especie vegetal se le agregaron dos litros de agua a una concentración de 50 mg glifosato (ácido equivalente, ae)/L (Fig. 1) (Bois et al. 2013), y se mantuvieron tres unidades por especie con agua sin glifosato (tratamientos control). Los mesocosmos se mantuvieron por 15 días en un diseño completamente al azar. El producto comercial que se empleó fue Faena Fuerte 360 con Transorb®. Este herbicida contiene 35,6 % de ingrediente activo (sal de potasio de *N*-[fosfometil] glicina), equivalente a 363 g de ácido de glifosato (ae)/L, y 64,4 % de ingredientes inertes como acarreadores, anticongelantes, antiespumantes, colorantes y surfactantes (Monsanto Company).

### Cuentas viables

Una célula viable es aquella que puede dividirse y formar descendencia (Madigan et al. 2012); en este trabajo se evaluó mediante el recuento en placas después de la exposición al herbicida, en el día 16 de exposición.

Se colectó al azar una de las tres plantas de cada unidad experimental. Para la obtención del área de la rizósfera, se siguió el protocolo descrito por Barillot et al. (2013). A cada planta se le eliminó el suelo por agitación manual cuidando la integridad de las raíces. Se pesaron 0,5 g de raíces jóvenes de cada individuo, después a cada muestra se le agregó 5 mL de NaCl al 0,9 %, se incubó a 200 rpm por 90 min a 25 °C y se centrifugó a 150 x g por 10 min. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios.

Un mililitro del sobrenadante de rizósfera se empleó para realizar diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1 % (Franco-Correa 2008). Las diluciones seriadas se realizaron por triplicado para cada especie vegetal. De las últimas tres diluciones ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ), se inocularon 100  $\mu$ L en placas Petri con 1) medio agar nutritivo para bacterias (incluidos los actinomicetos), 2) medio selectivo agar avena con nistatina al 0,1 % para actinomicetos (Franco-Correa 2008) y 3) medio agar, dextrosa y papa (PDA, por sus siglas en

inglés) con cloranfenicol al 0,1 % para hongos. Las placas con medio agar nutritivo se incubaron a 37 °C durante diez días, mientras que las placas con medio agar avena y PDA se incubaron a 25 °C durante diez días. Para el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias, actinomicetos y hongos, se siguieron las indicaciones descritas por Hernández-Pérez y Giles-Gómez (2021).

### Actividades enzimáticas

Después de 16 días de exposición al herbicida, se colectó otra de las tres plantas de cada unidad experimental para realizar, por duplicado, determinaciones enzimáticas usando el sistema API® ZYM (BioMérieux). Para la obtención de las enzimas de rizósfera, se eliminó el suelo no rizosférico de cada planta. Luego, 0,5 g de raíces jóvenes de cada especie vegetal fue lavada con 5 mL de agua destilada estéril por 10 min. Posteriormente, el lavado de raíz se centrifugó a 380 x g por 5 min. Del sobrenadante obtenido, se agregó 65 µL a cada cúpula de la galería API® ZYM (BioMérieux). Este sistema fue empleado para conocer la actividad de 19 enzimas del metabolismo del fósforo (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa), carbono (esterasa, lipasa, esterasa/lipasa, α-galactosidasa, β-galactosidasa, β-glucuronidasa, α-glucosidasa, β-glucosidasa, α-fucosidasa, β-N-acetilglucosaminidasa, α-manosidasa) y nitrógeno (leucina arilamidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α-quimotripsina) (Ordoñez-Arévalo et al. 2018). Después, la galería se incubó a 37 °C durante 24 h, siguiendo las indicaciones del fabricante. La actividad enzimática se reportó en nanomoles de sustrato hidrolizado. Para una mejor visualización de los resultados, en la (Tabla 1), la intensidad se expresó usando el símbolo “+”.

### Análisis estadístico

A la cantidad de actinomicetos, bacterias y hongos de las tres especies vegetales evaluadas se les aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para conocer la normalidad de los datos y la prueba de Levene para conocer la homocedasticidad de varianza. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) o Kruskal Wallis, con un nivel de significancia de 0,05. El programa que se usó fue R versión 4.0.3 (The R Foundation for Statistical Computing). Los datos de la actividad enzimática se evaluaron mediante un análisis de componentes principales (PCA), para lo cual se emplearon dos factores: tipo de especie vegetal (*F. dichotoma*, *L. octovalvis* y *T. domingensis*) y aplicación del herbicida (con y sin glifosato), con 14 variables de respuesta (cada enzima que mostró actividad y grupo microbiano).

## RESULTADOS

### Cuentas viables

Los microorganismos cultivables se afectaron negativamente cuando las plantas fueron expuestas al herbicida (Fig. 2). La cantidad de bacterias se vio reducida en las tres especies vegetales ( $p = 0,005669$ ), siendo *F. dichotoma* la que presentó mayor disminución (94 %), seguido de *T. domingensis* (76 %) y *L. octovalvis* (68 %). En el caso de los actinomicetos, solo se observó reducción de UFC (90 %) en las plantas de *L. octovalvis* ( $p = 0,01157$ ). En cuanto a los hongos, hubo un decremento drástico de UFC (98 %) en *L. octovalvis* ( $p = 0,0008034$ ), aunque también hubo reducción en *T. domingensis* (32 %) (Fig. 2). Entre los tres grupos microbianos evaluados, se encontró que los actinomicetos no se afectaron negativamente en dos de las tres especies vegetales.

En la rizósfera de las plantas no expuestas al glifosato se encontró que habitan en mayor cantidad las bacterias totales (59 %) ( $p = 0,02689$ ), seguido de los actinomicetos (32 %) y los hongos (9 %) (Fig. 2). Siendo en *L. octovalvis* ( $p = 0,018$ ) la planta que notoriamente albergó más microorganismos de los tres grupos (196500 UFC) que el resto de las especies vegetales (*F. dichotoma*: 63765 UFC y *T. domingensis*: 24490 UFC). La cantidad de microorganismos cultivados mostró correlación con esta planta (Fig. 3).

### Actividades enzimáticas

En todos los tratamientos con y sin herbicida, se observó que hubo actividad principalmente en las enzimas relacionadas con el metabolismo del fósforo, seguido del carbono y del nitrógeno (Tabla 1). El perfil de actividades enzimáticas fue distinto en la rizósfera de las tres especies evaluadas. En las plantas expuestas al contaminante, por

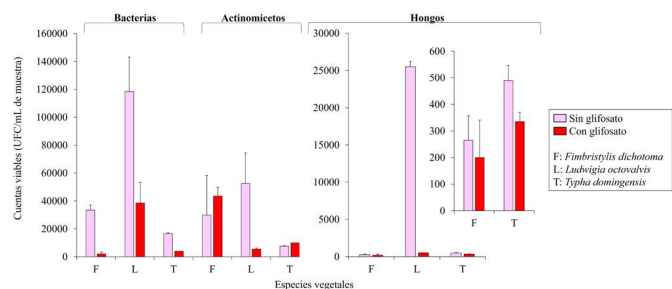
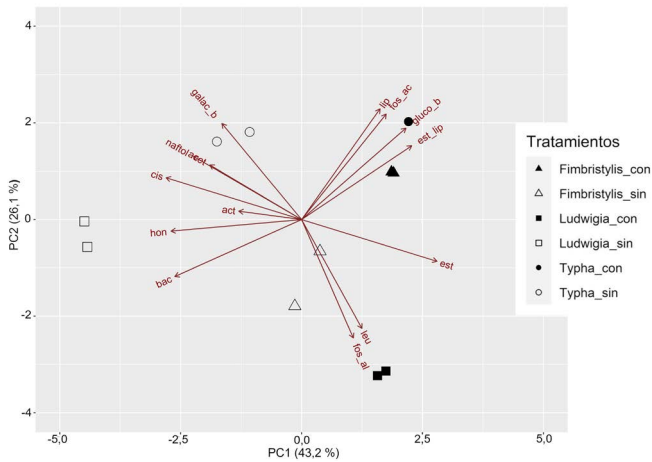


Fig. 2 Cuentas viables (UFC) de bacterias, actinomicetos y hongos aislados de la rizósfera de *F. dichotoma*, *L. octovalvis* y *T. domingensis*. Las barras indican la desviación estándar.



**Fig. 3** Correlación de las actividades de 11 enzimas y cantidad de UFC de tres grupos microbianos en la rizósfera de *F. dichotoma*, *L. octovalvis* y *T. domingensis*, evaluadas por un análisis de componentes principales. En el PCA se consideraron a las enzimas que presentaron actividad en el metabolismo del fósforo, carbono y nitrógeno.

ejemplo *L. octovalvis*, mostró aumento principalmente en la fosfatasa alcalina y la leucina arilamidasa; también aumentaron la esterasa, lipasa/esterasa y  $\beta$ -glucosidasa. En *T. domingensis* se incrementó la esterasa, lipasa, lipasa/esterasa y, de manera importante, la  $\beta$ -glucosidasa. En *F. dichotoma* aumentó considerablemente la  $\beta$ -glucosidasa, aunque también aumentó la fosfatasa ácida y lipasa, lipasa/esterasa. Es importante mencionar que en las tres especies se observó aumento de  $\beta$ -glucosidasa y lipasa/esterasa, mientras que hubo disminución de naftol-AS-BI-fosfohidrolasa.

En el PCA, se observó que la respuesta entre los tratamientos con y sin el herbicida fue diferente (Fig. 3). En los mesocosmos sin glifosato se encontró la participación de enzimas de los tres metabolismos y hubo correlación con la cantidad de microorganismos cultivados en *L. octovalvis* y *T. domingensis*. En los sistemas con glifosato, se encontró correlación con una enzima del fósforo (fosfatasa ácida) y cuatro enzimas del metabolismo del carbono (lipasa,  $\beta$ -glucosidasa, esterasa/lipasa) en *F. dichotoma* y *T. domingensis*. Para el caso de *L. octovalvis* se encontró correlación con fosfatasa alcalina (fósforo) y leucina arilamidasa (nitrógeno).

## DISCUSIÓN

### Cuentas viables

En los tratamientos con el herbicida hubo una clara disminución en las poblaciones de los tres grupos microbianos analizados en la rizósfera de las tres especies de plantas. Las poblaciones bacterianas se vieron principalmente afectadas negativamente cuando estuvieron expuestas al

glifosato. Posiblemente se debió a que la gran mayoría de los microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) cuentan con la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) sensible al glifosato (Leino et al. 2021; Tall y Puigbò 2022). Por lo tanto, el contaminante afectó la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), y provocó estrés y daño oxidativo en los microorganismos (como sucede en plantas) (Fei et al. 2013; Thilo et al. 2021). La EPSPS, conocida también como aroA o EPSP sintasa (EC:2.5.1.19), participa en la ruta del shikimato, catalizando la transferencia del enolpiruvil del fosfoenolpiruvato (PEP) al 5-hidroxil del shikimato-3-fosfato (S3P) para producir 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) y fosfato inorgánico (Funke et al. 2006; Ramírez-Muñoz 2017). Como el glifosato es un inhibidor competitivo con el PEP, el herbicida se unió al complejo EPSP sintasa-S3P y bloqueó la producción de precursores necesarios para la síntesis de aminoácidos aromáticos (Ramírez-Muñoz 2017). Anteriormente, se mencionaba que la ruta del shikimato solo se encontraba en plantas y no afectaba a la microbiota en general. Sin embargo, existen reportes donde se constata que la ruta se encuentra en bacterias, actinomicetos y hongos (Zucko et al. 2010; Yi et al. 2015), lo que concuerda con nuestros resultados. En la naturaleza, alrededor del 57 % de las bacterias tienen la enzima EPSPS del tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ), la cual es sensible al glifosato; el 32 % de las bacterias cuentan con la EPSPS del tipo II-IV que proveen resistencia; y el 11 % aún no es clasificado (Leino et al. 2021). La EPSPS del tipo IV es rara encontrarla en la naturaleza, esta enzima ha sido identificada en el clado de las actinobacterias (Leino et al. 2021); lo que explicaría por qué en dos de las tres especies vegetales estudiadas, las poblaciones de actinomicetos no se modificaron significativamente con el glifosato. En el caso de los hongos, casi el 91 % poseen la EPSPS tipo I (Leino et al. 2021; Tall y Puigbò 2022), y es congruente a la disminución de las poblaciones, particularmente en *L. octovalvis*.

La reducción de poblaciones bacterianas sensibles al contaminante, que pueden ser menos abundantes, pero realizan funciones significativas para la comunidad, posiblemente afectó a la población de bacterias que tienen incompleta la ruta del shikimato, debido que este último grupo carece de metabolitos necesarios para su sobrevivencia (Newman et al. 2016a; Mesnage y Antoniou 2020; Rainio et al. 2021). Cabe mencionar que alrededor del 30 % de bacterias que establecen una interacción, patogénica, comensal o mutualista, con las plantas no poseen completa la ruta del shikimato, por lo que la obtención de compuestos aromáticos podría provenir de los producidos por el huésped o por otros microorganismos en la comunidad (Zucko et al. 2010).

En las tres especies vegetales, se encontró que las poblaciones bacterianas no se redujeron totalmente, posiblemente en la rizósfera existen microorganismos tolerantes o resistentes al glifosato. En *F. dichotoma* se han

**Tabla 1.** Actividad enzimática de la rizósfera de *F. dichotoma*, *L. octovalvis* y *T. domingensis*. Los resultados fueron obtenidos por duplicado. 0-4 nmol de sustrato hidrolizado, -; 5-9 nmol, +; 10-19 nmol, ++; 20-29 nmol, +++; 30-39 nmol, ++++; 40 nmol, +++++.

Enzima	Actividad enzimática					
	Sin glifosato			Con glifosato		
	<i>F. dichotoma</i>	<i>L. octovalvis</i>	<i>T. domingensis</i>	<i>F. dichotoma</i>	<i>L. octovalvis</i>	<i>T. domingensis</i>
<b>Metabolismo del fósforo</b>						
Fosfatasa alcalina	+++	+	++	++	++++	+
Fosfatasa ácida	+++	++	+++++	+++++	+++	+++++
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+++++	+++++	+++++	++++	+++	++++
<b>Metabolismo del carbono</b>						
Esterasa	+++	+	+	+++	+++	+++
Lipasa	-	-	-	+	-	+
Lipasa/esterasa	++	+	+++	+++	+++	+++++
α-Galactosidasa	-	-	-	-	-	-
β-Galactosidasa	-	+	+	-	-	+
β-Glucuronidasa	-	-	-	-	-	-
α-Glucosidasa	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidasa	+	-	+	+++++	+	+++++
α-Fucosidasa	-	-	-	-	-	-
β-N-acetilglucosaminidasa	-	-	+	-	-	-
α-Manosidasa	-	-	-	-	-	-
<b>Metabolismo del nitrógeno</b>						
Leucina arilamidasa	-	-	-	-	++++	+
Valina arilamidasa	-	-	-	-	-	-
Cistina arilamidasa	-	+	+	-	-	-
Tripsina	-	-	-	-	-	-
α-Quimotripsina	-	-	-	-	-	-

encontrado bacterias con tolerancia de hasta 40 g glifosato ae/L (López-Chávez et al. 2021). Algunas bacterias se adaptan rápidamente y se vuelven resistentes por cambios pequeños en el sitio activo de la EPSPS o porque reciben copias de genes de EPSPS por transferencia horizontal de parte de alguna cepa resistente (Rainio et al. 2021).

Entre las plantas evaluadas, *L. octovalvis* mostró la reducción más drástica de UFC en todos los microorganismos cultivables. La pérdida de grupos microbianos que comúnmente habitan en las rizósfera, tales como micorrizas, actinomicetos, bacterias promotoras del crecimiento (PGPR), antagonistas de patógenos, podrían comprometer la productividad vegetal (Hol et al. 2015). Posiblemente, dicha planta junto con su microbioma, no han estado en constante presión por parte de este herbicida. Cabe mencionar, que esta planta fue colectada en sitios con menor concentración de glifosato (0,46 µg/L), en comparación con el resto de las especies evaluadas, las cuales se colectaron en sitios con 6,6 µg glifosato/L (Ruiz-Toledo et al. 2014).

### Actividades enzimáticas

El glifosato también afectó las actividades metabólicas en rizósfera cuyos perfiles fueron diferentes en las tres especies, sin embargo, coincidieron en enzimas relacionadas al metabolismo de fósforo y carbono. En presencia del glifosato, la dinámica enzimática del metabolismo del fósforo fue afectado en las tres especies vegetales, evidenciada por el aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina o fosfatasa ácida, y una disminución de naftol-AS-BI-fosfohidrolasa. Ese efecto probablemente se debió al aumento en el contenido de fósforo ocasionado por una sucesión de eventos desencadenados por el herbicida. Por un lado, la muerte de los microorganismos sensibles al compuesto y la degradación del material vegetal acumulado en el suelo provocó liberación de estructuras ricas en fósforo, como son ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos. La misma mineralización del glifosato a sarcosina o del AMPA a metilamina pudo liberar fosfatos (Wang et al. 2016). Por otro lado, las plantas pudieron excretar exudados

fosforados (nucleótidos) para favorecer el mantenimiento de microorganismos benéficos, degradadores de glifosato, PGPR, antagonistas de patógenos y micorrizas (Li et al. 2021). Así también, los exudados secretados, como los ácidos orgánicos y los restos celulares desechados al medio, pudieron ocasionar cambios en los parámetros fisicoquímicos de la rizósfera, provocando la liberación del fósforo unido a complejos estables con cationes ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ) (Mohanram y Kumar 2019; Singh et al. 2022).

En cuanto al metabolismo del carbono, en la rizósfera de las tres especies se encontró mayor actividad en las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y lipasa/esterasa. Posiblemente, las plantas liberaron exudados para que los microorganismos recalcitrantes, incluidos los tolerantes o resistentes al glifosato, tuvieran disponibilidad de nutrientes, redujeran la toxicidad del compuesto y estabilizaran el sistema (Gianfreda 2015; Bilyera et al. 2021). La  $\beta$ -glucosidasa participa en el proceso de degradación de la celulosa, donde se generan compuestos orgánicos fácilmente degradables. En las raíces se ha asociado el alto contenido de estos compuestos con el incremento de las poblaciones microbianas (Sanullah et al. 2016; Adetunji et al. 2017). Ya se ha reportado el aumento en la actividad enzimática de las enzimas lipasa, esterasa y  $\beta$ -glucosidasa inducido por la descomposición de la materia orgánica de las células colapsadas, después de 56 días de exposición del glifosato (López-Chávez et al. 2021). En el caso de las lipasas/esterasas catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles, tioésteres y fosfolípidos (Fang et al. 2014). Posiblemente como las células fúngicas y de actinomicetos sufrieron daño oxidativo, éstas colapsaron, liberándose compuestos de reserva, tales como triacilgliceroles, los cuales son acumulados en periodos de estrés metabólico (Álvarez y Steinbüchel 2002). Por otro lado, la actividad de las lipasas/esterasas pudo deberse para contrarrestar el daño por el glifosato debido a que participan en el crecimiento de las plantas y en respuesta de las plantas al estrés abiótico.

En cuanto al metabolismo del nitrógeno, el aumento en la actividad de la enzima leucina arilamidasa en *L. octovalvis* posiblemente se dio porque existía abundancia de proteínas ricas en leucina, provenientes de exudados y restos de la muerte celular. Estos compuestos resultan ser poco asimilables por los microorganismos, por tanto, para hacerlos biodisponibles fueron hidrolizados. Dado que *L. octovalvis* fue la planta con un sistema radicular menos ramificado, posiblemente estimuló la proliferación de microorganismos benéficos para su sobrevivencia y activó mecanismos de defensa contra patógenos por la producción de proteínas con dominios repetidos ricas en leucinas, tales como NB-LRR polimórficas (Yu et al. 2022). En plantas jóvenes de *Phaseolus vulgaris* L. expuestas a estrés abiótico, se ha observado mayor actividad de la enzima leucina aminopeptidasa y abundancia de exudados vegetales de

bajo peso molecular (Haase et al. 2008). En suelo, se ha reportado que la actividad arilamidasa está correlacionada con el contenido de carbono orgánico (Acosta-Martínez y Tabatabai 2001). Cabe mencionar que en *L. octovalvis* hubo una disminución drástica de microorganismos pudiendo incrementar la materia orgánica en la rizósfera.

Dentro de los mesocosmos, el glifosato impactó de forma negativa en las poblaciones microbianas, principalmente en bacterias y hongos, provocando su muerte celular y el desbalanceo metabólico en la rizósfera, evidenciado por las actividades enzimáticas; esto ocasionado por el cambio en sus comunidades microbianas y por la respuesta de la planta al contaminante. *F. dichotoma* y *T. domingensis* mostraron ciertas similitudes: aumento en sus poblaciones de actinomicetos y en la expresión de enzimas del metabolismo del carbono. Posiblemente, estas especies vegetales cuentan con actinomicetos capaces de degradar al glifosato y promover el crecimiento vegetal, aprovechando los exudados excretados en la rizósfera a causa del herbicida (Kremer et al. 2005; Giaccio et al. 2023). A pesar del daño en las poblaciones microbianas de rizósfera, estas plantas podrían contribuir en la remoción del glifosato en sitios contaminados por lo que podrían ser útiles en programas de reforestación en zonas riparias o en estrategias de biorremediación.

## CONCLUSIONES

Las plantas riparias contribuyen en los servicios ecosistémicos, perjudicar su microbioma ocasionaría alteraciones en los procesos biogeoquímicos del suelo y por lo tanto daños en el funcionamiento en los ecosistemas. En este estudio, se evidenció que las poblaciones de bacterias, incluyendo actinomicetos, y hongos de la rizósfera de las plantas riparias estudiadas, se ven afectadas por el glifosato (50 mg ae/L). De igual manera, se encontró que el glifosato induce variaciones en el perfil metabólico de P, C y N en la rizósfera por los cambios provocados en la microbiota, la respuesta de la planta al contaminante y el desbalance en su diversidad microbiana.

## PARTICIPACIÓN DE AUTORES

Karina GUILLÉN-NAVARRO contribuyó en la conceptualización, redacción-revisión de la propuesta original y el manuscrito, supervisión, recursos, administración del proyecto. Dulce INFANTE-MATA, Teresa ÁLVAREZ-LEGORRETA y Michael F. DUNN contribuyeron en la conceptualización, redacción-revisión de la propuesta original y el manuscrito, supervisión. Mariana Y. LÓPEZ-CHÁVEZ contribuyó en la conceptualización, metodología, análisis de resultados, redacción-revisión de la propuesta original y el manuscrito, edición y visualización.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Karina Velasco, Alejandra Nájera y Verónica García por la ayuda en el trabajo experimental. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) de México por la beca 462334.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

## REFERENCIAS

- Acosta-Martínez, V. and Tabatabai, M. A. (2001). Arylamidase activity in soils: effect of trace elements and relationships to soil properties and activities of amidohydrolases. *Soil Biol Chem*, 33(1), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00109-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00109-7)
- Adetunji, A. T., Lewu, F. B., Mulidzi, R. and Ncube, B. (2017). The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *J Soil Sci Plant Nutr*, 17(3), 794-807. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000300018>
- Alvarez, H. M. and Steinbüchel, A. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 367-376. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1135-0>
- Barillot, C. D. C., Sarde, C. O., Bert, V., Tarnaud, E. and Cochet, N. (2013). A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplane soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann Microbiol*, 63, 471-476. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-012-0491-y>
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M. and Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *JAWRA*, 50(2), 275-290. <https://doi.org/10.1111/jawr.12159>
- Bilyera, N., Zhang, X., Duddek, P., Fan, L., Banfield, C. C., Schlüter, S., Carminati, A., Kaestner, A., Ahmed, M. A., Kuzakov, Y., Dippold, A. M., Spielvogel, S. and Razavi, B. S. (2021). Maize genotype-specific exudation strategies: an adaptive mechanism to increase microbial activity in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem*, 162, 108426. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108426>
- Bois, P., Huguenot, D., Jézéquel, K., Lollier, M., Cornu, J. Y. and Lebeau, T. (2013). Herbicide mitigation in microcosms simulating stormwater basins subject to polluted water inputs. *Water Res*, 47(3), 1123-1135. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.029>
- Dosskey, M. G., Vidon, P., Gurwick, N. P., Allan, C. J., Duval, T. P. and Lowrance, R. (2010). The role of riparian vegetation in protecting and improving chemical water quality in streams. *JAWRA*, 46(2), 261-277. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1752-1688.2010.00419.x>
- Fang, Z., Li, J., Wang, Q., Fang, W., Peng, H., Zhang, X. and Xiao, Y. (2014). A novel esterase from a marine metagenomic library exhibiting salt tolerance ability. *J Microbiol Biotechnol*, 24(6), 771-780. <https://doi.org/10.4014/jmb.1311.11071>
- Fei, Y. Y., Gai, J. Y. and Zhao, T. J. (2013). Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of *Enterobacter*. *FEMS Microbiol Lett*, 349(2), 135-143. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12306>
- Franco-Correa, M. (2008). *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de 519 estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. [Tesis de doctorado, Universidad de Granada]. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/2110>
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M. and Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of roundup ready crops. *PNAS*, 103(35), 13010-13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Giaccio, G. C. M., Laterra, P., Aparicio, V. C. and Costa, J. L. (2016). Glyphosate retention in grassland riparian areas is reduced by the invasion of exotic trees. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 85, 108-116. <https://doi.org/10.32604/phyton.2016.85.108>
- Giaccio, G. C. M., Saez, J. M., Estévez, M. C., Salinas, B., Corral, R. A., De Gerónimo, E., Aparicio, V. and Álvarez, A. (2023). Developing a glyphosate-bioremediation strategy using plants and actinobacteria: potential improvement of a riparian environment. *J Hazard Mater*, 446, 130675. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130675>
- Gianfreda, L. (2015). Enzymes of importance to rhizosphere processes. *J Soil Sci Plant Nutr*, 15(2), 283-306. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000022>
- Gunarathna, S., Gunawardana, B., Jayaweera, M., Manatunge, J. and Zoysa, K. (2018). Glyphosate and AMPA of agricultural soil, surface water, groundwater and sediments in areas prevalent with chronic kidney disease of unknown etiology, Sri Lanka. *J Environ Sci Health B*, 53(11), 729-737. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1480157>
- Haase, S., Philippot, L., Neumann, G., Marhan, S. and Kandeler, E. (2008). Local response of bacterial densities and enzyme activities to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and different N supply in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biol Biochem*, 40, 1225-1234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.025>
- Helander, M., Saloniemi, I. and Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends Plant Sci*, 17(10), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.008>
- Hénault-Ethier, L., Lucotte, M., Moingt, M., Paquet, S., Maccario, S., Smedbol, E., Gomes, M. P., Lepage, L., Juneau, P. and Labrecque, M. (2017). Herbaceous or



- Salix miyabeana* 'SX64' narrow buffer strips as a means to minimize glyphosate and aminomethylphosphonic acid leaching from row crop fields. *Sci Total Environ*, 598, 1177-1186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.104>
- Hernández-Pérez, H. A. y Giles-Gómez, M. (2021). *Métodos microbiológicos para el análisis de alimentos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hol, W. H. G., de Boer, W., de Hollander, M., Kuramae, E. E., Meisner, A. and van der Putten, W. H. (2015). Context dependency and saturating effects of loss of rare soil microbes on plant productivity. *Front Plant Sci*, 6, 485. <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00485>
- Kremer, R. J. K., Means, N. E. and Kim, S. (2005). Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere microorganisms. *Int J Environ Anal Chem*, 85(15), 1165-1174. <https://doi.org/10.1080/03067310500273146>
- Kremer, R. J. and Means, N.E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *Eur J Agron*, 31(3), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>
- Labrada, R. y Parker, C. (1996). El control de malezas en el contexto del manejo integrado de plagas. En R. Labrada, J. C. Caseley y C. Parker, (Ed.), *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s05.htm>
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemä, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S. and Puigbó, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *J Hazard Mater*, 408, 124556. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
- Li, J., Wang, C., Liang, W. and Liu, S. (2021). Rhizosphere microbiome: the emerging barrier in plant-pathogen interactions. *Front Microbiol*, 12, 772420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.772420>
- López-Chávez, M. Y., Alvarez-Legorreta, T., Infante-Mata, D., Dunn, M. F. and Guillén-Navarro, K. (2021). Glyphosate-remediation potential of selected plant species in artificial wetlands. *Sci Total Environ*, 781, 146812. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146812>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A. and Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms*. Editorial Pearson.
- Mesnager, R. and Antoniou, M. N. (2020). Computational modelling provides insight into the effects of glyphosate on the shikimate pathway in the human gut microbiome. *CRTOX*, 1, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.crtox.2020.04.001>
- Mijangos, I., Becerril, J. M., Albizu, I., Epelde, L. and Garbisu, C. (2009). Effects of glyphosate on rhizosphere soil microbial communities under two different plant compositions by cultivation-dependent and -independent methodologies. *Soil Biol Biochem*, 41(3), 505-513. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.12.009>
- Mohanram, S. and Kumar, P. (2019). Rhizosphere microbiome: revisiting the synergy of plant-microbe interactions. *Ann Microbiol*, 69, 307-320. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01448-9>
- Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C. and Kloepper, J. (2016a). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci Total Environ*, 543, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.008>
- Newman, M. M., Lorenz, N., Hoilett, N., Lee, N. R., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C. and Kloepper, J. W. (2016b). Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci Total Environ*, 553, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.078>
- Ordoñez-Arévalo, B., Guillén-Navarro, K., Huerta, E., Cuevas, R. and Calixto-Romo, M. A. (2018). Enzymatic dynamics into the *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) gut during vermicomposting of coffee husk and market waste in a tropical environment. *Environ Sci Pollut Res*, 25, 1576-1586. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0572-3>
- Pérez, D. J., Okada, E., Menone, M. L. and Costa, J. L. (2017). Can an aquatic macrophyte bioaccumulate glyphosate? Development of a new method of glyphosate extraction in *Ludwigia peploides* and watershed scale validation. *Chemosphere*, 185, 975-982. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.093>
- Rainio, M. J., Ruuskanen, S., Helander, M., Saikkonen, K., Saloniemä, I. y Puigbó, P. (2021). Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Environ Microbiol Rep*, 13(3), 309-316. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12931>
- Ramírez-Muñoz, F. (2017) *Mecanismo de resistencia de Paspalum paniculatum L. (Poaceae) al herbicida glifosato*. [Tesis de doctorado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/10069>
- Ruiz-Toledo, J., Castro, R., Rivero-Pérez, N., Bello-Mendoza, R. and Sánchez, D. (2014). Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *BECT*, 93, 289-293. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1328-0>
- Sanaullah, M., Razavi, B. S., Blagodatskaya, E. V. and Kuzyakov, Y. (2016). Spatial distribution and catalytic mechanisms of  $\beta$ -glucosidase activity at the root-soil interface. *Biol Fertil Soils*, 52, 505-514. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1094-8>
- Schafer, J. R., Hallett, S. G. and Johnson, W. G. (2014). Rhizosphere microbial community dynamics in glyphosate-treated susceptible and resistant biotypes of giant ragweed (*Ambrosia trifida*). *Weed Sci*, 62(2), 370-381. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00164.1>
- Sesin, V., Davy, C. M., Dorken, M. E., Gilbert, J. M. and Freeland, J. R. (2019). Variation in glyphosate effects and accumulation in emergent macrophytes. *Manag Biol Invasions*, 11, (in press).

- Singh, S. K., Wu, X., Shao, C. and Zhang, H. (2022). Microbial enhancement of plant nutrient acquisition. *Stress Biol*, 2(3). <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00027-w>
- Tall, T. and Puigbò, P. (2022). Rethinking the intrinsic sensitivity of fungi to glyphosate. *Bio Tech*, 11(3), 28. <https://doi.org/10.3390/biotech11030028>
- Thilo, J. S. K., Batsukh, S., Bauer, E., Hirota, B., Weiss, B., Wierz, J. C., Fukatsu, T., Kaltenpoth, M. and Engl, T. (2021). Inhibition of a nutritional endosymbiont by glyphosate abolishes mutualistic benefit on cuticle synthesis in *Oryzaephilus surinamensis*. *Commun Biol*, 4(554). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02057-6>
- Wang, S., Seiwert, B., Kästner, M., Miltner, A., Schäffer, A., Reemtsma, T., Yang, Q. and Nowak, K. M. (2016). (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms - A stable isotope co-labeling approach. *Water Res*, 99, 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.041>
- Yi, S.-Y., Wu, G.-B., Lin, Y.-J., Hu, N. and Liu, Z.-D. (2015). Characterization of a new type of glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Isoptericola variabilis*. *J Mol Cat B Enzym*, 111, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.009>
- Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J. and Niu, D. (2022). Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants*, 11(3), 386. <https://doi.org/10.3390/plants11030386>
- Zhang, Q., Zhou, H., Li, Z., Zhu, J., Zhou, C. and Zhao, M. (2016). Effects of glyphosate at environmentally relevant concentrations on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa*. *Environ Monit Assess*, 188(632). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5627-2>
- Zucko, J., Dunlap, W. C., Shick, J. M., Cullum, J., Cercelet, F., Amin, B., Hammen, L., Lau, T., Williams, J., Hranueli, D. and Long, P. F. (2010). Global genome analysis of the shikimic acid pathway reveals greater gene loss in host-associated than in free-living bacteria. *BMC Genom*, 11(628). <https://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-628>