

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTOS DE LA OXITETRACICLINA EN UN SISTEMA DE
BIOPURIFICACIÓN: ELIMINACIÓN DE TRIAZINAS Y
ORGANOFOSFORADOS Y VARIACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE
DEGRADACIÓN**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología, para optar por el grado y título de Maestría Académica en Microbiología

MARTA EUGENIA PÉREZ VILLANUEVA

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2020

Dedico esta tesis a mi familia que ha sido una motivación enorme para proponer y cosechar mis metas. Nada es imposible si se lucha y persevera día a día.

Agradecimientos:

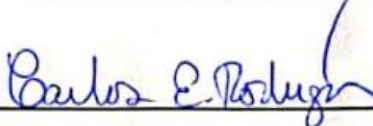
Gracias a todas esas personas que de una forma u otra me apoyaron, ayudaron y acompañaron durante el largo proceso de esta tesis, al CICA, al LAIMEC, al CENIBiot, al CIBCM, al CIET y a todas las personas involucradas en cada centro que me dieron una mano, me recibieron, permitieron que usara sus instalaciones y sus equipos, además de atender mis consultas para poder llevar a cabo esta tesis.

A todas las personas que de una forma u otra han sido parte de esta tesis, colaborando conmigo de distintas maneras; con ayuda en el laboratorio, compartiéndome reactivos, discutiendo los resultados que iba obteniendo, dando consejos y guía, o simplemente compartiendo este proceso conmigo en un camino de altibajos, pero de mucho aprendizaje, a Diego, a Teresita, a María Laura, a Fabián, a César J., a Carlos Chacón y a Camilo por toda su ayuda. A Silvia y a Jeffrey por siempre escucharme y compartir de cerca los momentos de frustración, de éxito y de alegría y a todos los que no mencioné pero que han seguido de cerca este proceso conmigo. A todos muchas gracias, sin ustedes esta tesis no estaría concluida el día de hoy.

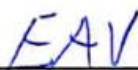
Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e Inmunología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Microbiología



Ph.D. César Rodríguez Sánchez
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado



Ph.D. Carlos Esteban Rodríguez Rodríguez
Profesor Guía



M.Sc. Emanuel Araya Valverde
Lector



Ph.D. Max Chavarría Vargas
Lector



M.Sc. Fabio Granados Chinchilla
Representante Director del Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología,
Química Clínica e Inmunología



Marta Eugenia Pérez Villanueva
Sustentante

Tabla de Contenidos

Resumen	viii
Lista de cuadros	ix
Lista de figuras.....	x
1. Introducción	1
1.1. Actividad agrícola en Costa Rica.....	1
1.2.1. Organofosforados.....	3
1.2.2. Triazinas	5
1.3. Sistemas de Biopurificación de Plaguicidas	7
1.4. Degradación bacteriana de organofosforados y triazinas	9
1.4.1. Degradación de organofosforados (OP).....	9
1.4.2. Degradación de triazinas	100
1.5. Antibióticos de uso agrícola	11
2. Justificación	13
3. Hipótesis	14
4. Objetivo General	15
4.1. Objetivos Específicos.....	15
5. Estrategia metodológica.....	16
6. Materiales y métodos.....	17
6.1. Reactivos, materiales y equipo	17
6.1.1. Reactivos químicos	17
6.1.2. Biomezcla	17
6.1.3. Medio mínimo.....	18
6.2. Procedimientos experimentales	18
6.2.1. Ensayo de eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en la biomezcla a diferentes concentraciones de oxitetraciclina, ensayos toxicológicos y ensayos de cuantificación génica	18
6.2.2. Ensayo de NMP para la cuantificación de degradadores de atrazina (NMP-TTC).....	19
6.2.3. Ensayo de NMP por mineralización de ¹⁴ C-CLP para la cuantificación de degradadores de clorpirifós (NMP- ¹⁴ C)	20
6.3. Procedimientos analíticos	20

6.3.1.	Extracción y cuantificación de plaguicidas	20
6.3.2.	Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	22
6.3.3.	Ensayo de fitotoxicidad con <i>Lactuca sativa</i>	23
6.3.4.	Determinación $^{14}\text{CO}_2$ del ensayo de ^{14}C -NMP.....	23
6.4.	Análisis de expresión de genes de degradación de organofosforados y triazinas	24
6.4.1.	Extracción de ADN total	24
6.4.2.	PCR punto final.....	24
6.4.3.	Obtención de controles positivos para el qRT-PCR	24
6.4.4.	PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)	25
7.	Resultados	28
7.1.	Eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en presencia de oxitetraciclina	28
7.2.	Toxicidad residual de la biomezcla durante el tratamiento de organofosforados y triazinas en co-aplicación con oxitetraciclina.....	33
7.3.	Cuantificación de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas durante su eliminación en la biomezcla	34
7.3.1.	Selección de los imprimadores y genes a evaluar en el qPCR	34
7.3.2.	Obtención de controles positivos para qPCR	35
7.3.3.	PCR punto final para los genes 16S Wang, 16S Monard, <i>atzA</i> , <i>atzD</i> , <i>opd</i> y <i>opdA</i> y su presencia en el tiempo	36
7.3.4.	qPCR para los genes <i>atzA</i> y <i>opd</i> en el tiempo	37
7.4.	Cuantificación de los microorganismos viables en la biomezcla con capacidad de degradar atrazina o clorpirifós	38
7.4.1.	NMP de degradadores de clorpirifós por mineralización de ^{14}C -CLP.....	39
7.4.2.	NMP de degradadores de atrazina (NMP-ATZ).....	40
8.	Discusión	42
8.1.	Eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en presencia de oxitetraciclina	42
8.2.	Toxicidad residual de la biomezcla durante el tratamiento de organofosforados y triazinas en co-aplicación con oxitetraciclina.....	50
8.3.	Cuantificación de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas durante su eliminación en la biomezcla	53
8.4.	Cuantificación de los microorganismos viables en la biomezcla con capacidad de degradar atrazina o clorpirifós	56

9. Conclusiones	61
10. Referencias.....	62
Anexos	81
Anexo 1. Resultados de pruebas preliminares para la ejecución del qPCR.....	81

Resumen

La contaminación que provoca el mal uso de agroquímicos y el manejo inadecuado de sus desechos, puede afectar cuerpos de agua superficiales o subterráneos y grandes volúmenes de suelo. Los plaguicidas organofosforados y triazinas son dos familias químicas ampliamente utilizadas y podrían contribuir de manera relevante a esta problemática. Por su parte los sistemas de biopurificación de plaguicidas (SBP) son una opción amigable con el ambiente para el tratamiento de aguas contaminadas de forma puntual por el uso y aplicación de plaguicidas, sin embargo, al co-aplicar antibióticos de uso agrícola como la oxitetraciclina (OTC) los procesos degradativos en la biomezcla podrían verse afectados negativamente. En este trabajo, se analizó el efecto de la OTC a dos concentraciones diferentes, en la eliminación de los organofosforados clorpirifós (CLP), metamidofós (MTM), monocrotofós (MNC) y cadusafós (CDF) y las triazinas atrazina (ATZ), ametrina (AMT), terbutilazina (TBZ) y terbutrina (TBT) en una biomezcla de SBP, por medio de pruebas de eliminación, toxicidad residual de la biomezcla, cuantificación por NMP de poblaciones de degradadores y estudio de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas. A los 11 días la mayoría de los plaguicidas había sido eliminado en su totalidad sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos con y sin OTC, a excepción de AMT, TBT, TBZ y CLP, que presentaron diferencias entre al menos uno de los tratamientos, por su parte la OTC al cabo de los 60 días se eliminó entre un 60-70 %. La toxicidad residual de la biomezcla se redujo en más de un 90 % para *D. magna* y entre un 22.4 % y 36.7 % para *L. sativa*. Los genes *atzA* y *opd* están aparentemente presentes en las biomezclas con y sin OTC y se obtuvieron resultados preliminares de su cuantificación respaldando su presencia. La cuantificación por NMP de las poblaciones degradadoras de ATZ y CLP mostró una afectación de las poblaciones por la presencia de OTC, con de reducciones de 1 a 5 logaritmos. Por lo tanto, la biomezcla de SBP utilizada es de las más eficientes probadas hasta el momento para la eliminación de organofosforados y triazinas y también es capaz de degradar la OTC. Adicionalmente, la presencia de OTC, aunque tiene un efecto negativo en la microbiota de la biomezcla el cual debe ser estudiado a mayor profundidad, no afecta el resultado final en la eliminación de los plaguicidas, por lo que la biomezcla se recomienda para el tratamiento simultáneo de plaguicidas y OTC bajo las condiciones probadas en esta investigación.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Características de algunos plaguicidas de uso en Costa Rica	4
Cuadro 2. Transiciones seleccionadas y otros parámetros en la detección de organofosforados y triazinas en la biomezcla, utilizando el método de monitoreo dinámico de reacción múltiple (dMRM)	21
Cuadro 3. Secuencias de los imprimadores utilizados para los ensayos de expresión.....	27
Cuadro 4. Resumen de vidas medias y porcentajes de eliminación a los 60 días para cada uno de los agroquímicos estudiados	31
Cuadro 5. Cambios netos de disminución de toxicidad en la biomezcla durante la eliminación de triazinas, organofosforados y oxitetraciclina	34
Cuadro 6. Resultados del PCR punto final de los tratamientos B+M, B+M+OTC10 y B+M+OTC50 en el tiempo	36
Cuadro 7. Índices de cuantificación de los genes <i>atzA</i> y <i>opd</i> en la biomezcla sometida a diferentes tratamientos y su variación en el tiempo	37
Cuadro 8. Comparación de las DT50 reportados previamente en SBP para los plaguicidas estudiados y OTC	43
Cuadro A1. Calidad del ADN purificado de las bandas para usar como controles positivos en el qPCR	83
Cuadro A2. Cuantificación en fluorímetro del ADN de las muestras para qPCR.....	83
Cuadro A3. Pendiente y eficiencia de las curvas de calibración realizadas con los genes <i>housekeeping</i>	83

Lista de figuras

Figura 1. Estructura general de los plaguicidas organofosforados	3
Figura 2. Estructura química de algunos plaguicidas organofosforados	4
Figura 3. Estructura química general de los plaguicidas triazinas	6
Figura 4. Estructura química de algunos plaguicidas de la familia de las triazinas	6
Figura 5. Representación esquemática del diseño original de un SBP	8
Figura 7. Eliminación de triazinas en la biomezcla a diferentes concentraciones de oxitetraciclina.....	30
Figura 8. Perfil de concentración de oxitetraciclina durante la eliminación de triazinas y organofosforados en una biomezcla	31
Figura 9. Cambios en la toxicidad residual en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de triazinas y organofosforados	33
Figura 10. Gel de agarosa con los productos de amplificación de las diluciones de ADN con los imprimadores 16S Monard (A) y 16S Wang (B) para ver inhibidores	35
Figura 11. Gel de electroforesis con las bandas seleccionadas para purificar y usar el ADN como control positivo.....	35
Figura 12. Cambios en el NMP de los degradadores de CLP en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de plaguicidas triazinas y organofosforados	40
Figura 13. Cambios en el NMP de los degradadores de ATZ en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de plaguicidas triazinas y organofosforados	41
Figura A1. Productos de PCR punto final obtenidos en diferentes condiciones de trabajo.	81
Figura A2. Productos de PCR punto final de los tratamientos B+M, B+M+OTC10 y B+M+OTC50 en el tiempo	82



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Marta Eugenia Pérez Villanueva, con cédula de identidad 1-14510220, en mi condición de autor del TFG titulado Efectos de la oxitetraciclina en un sistema de Biopurificación: Eliminación de triazinas y organofosforados y variación en la expresión de genes de degradación

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Marta Eugenia Pérez Villanueva

Número de Carné: A94743 Número de cédula: 1-1451-0220

Correo Electrónico: marta.perez@ucr.ac.cr

Fecha: 14 de julio de 2020 Número de teléfono: 89377404

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Ph.D. Carlos Esteban Rodríguez Rodríguez

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Introducción

A nivel mundial la actividad agrícola ha cumplido un papel importante en el desarrollo de las sociedades, y continúa siendo uno de los pilares de la economía. Sin embargo, diferentes actividades están asociadas a la agricultura, entre ellas el uso de plaguicidas, que a pesar de los grandes aportes que ha generado, como el control de vectores de enfermedades tanto para cultivos como para humanos, mejoras en el rendimiento de la producción, entre otros, se ha definido también como un factor contribuyente a la problemática ambiental (Waite et al., 2002).

Estas sustancias en muchas ocasiones se utilizan y desechan indebidamente, y aunado a los procesos naturales de migración de los plaguicidas, estos químicos pueden llegar a diversos compartimentos ambientales contaminándolos (Valls-Cantenys et al., 2016). También se ha reportado entre algunos efectos de los plaguicidas, la muerte de peces, fallo reproductivo en pájaros y muerte en humanos (Ewence et al., 2015).

1.1. Actividad agrícola en Costa Rica

A pesar que la actividad agrícola en el país ha sufrido un descenso en las últimas décadas, aún sigue siendo una de las principales actividades económicas en Costa Rica, superada solo por las actividades financieras, actividades de información y comunicaciones, servicios profesionales y actividades de transporte y almacenamiento (Jiménez-Fontana, 2019). Para el año 2018 tuvo una tasa de crecimiento del producto interno bruto (PIB) junto con la silvicultura y pesca de aproximadamente el 2.0 %, valor menor al correspondiente para el año 2017, pero cercano a lo reportado para el promedio quinquenal (Jiménez-Fontana, 2019).

Los productos agrícolas, además de ser distribuidos para consumo nacional también se exportan, lo que para el año 2014 representó el 23.3 % de todos los productos exportados por el país (Alonso y Jiménez-Fontana, 2015). Además, en el 2015 la oferta exportable de estos productos fue de más del 70 %, siendo apenas un 8.3 % para el consumo nacional (SEPSA, 2015).

Según el vigésimo primer informe del estado de la nación correspondiente al año 2015, para ese año la mayoría de los sectores económicos no alcanzó su nivel promedio de largo

plazo, sin embargo, la agricultura fue uno de los pocos que superaron, por poco, el crecimiento promedio de los últimos veintidós años (Alonso y Jiménez-Fontana, 2015).

1.2. Uso de plaguicidas

Directamente relacionado a la actividad agrícola, como se ya se mencionó, está el uso de plaguicidas, sin embargo, es necesario aclarar que no solamente esta industria aprovecha los beneficios de estas sustancias. Otros usos comunes aunque en menor cantidad son, en la ganadería, para el mantenimiento de la salud pública con el control de vectores e incluso el uso doméstico (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Según el Censo Agropecuario del 2015 en el país el 82.1 % de los productores utiliza fertilizantes, mientras que el 90.1 % hace uso de plaguicidas en sus cultivos para controlar diversas plagas. Además, el Servicio Fitosanitario del Estado reporta que entre los años 2013 y 2014 las importaciones de plaguicidas aumentaron de 7.4 a 7.8 millones de kilogramos de ingrediente activo, y las exportaciones a su vez disminuyeron de 3.4 a 2.7 millones de kilogramos de ingrediente activo. Según estas mismas estadísticas la cantidad remanente de plaguicida que permanece en el país y es utilizado en las actividades agrícolas correspondió a 7.0 y 8.1 millones de kilogramos de ingrediente activo para el 2013 y el 2014 respectivamente (Corrales y Chacón, 2015). Para el año 2016, último del que se cuenta con reporte, se mantuvo una tendencia similar a pesar que las importaciones de plaguicida bajaron a 6.7 millones de kilogramos de ingrediente activo (Merino y Chacón, 2018).

Según la plaga a controlar, estos plaguicidas se clasifican en insecticidas, herbicidas, nematocidas o fungicidas. Otra manera de clasificarlos es según su familia química, dentro de la cual comparten propiedades y por lo general un modo de acción similar (Ramírez y Lacasaña, 2001). Los plaguicidas organoclorados por ejemplo, hace algunas décadas fueron ampliamente utilizados como insecticidas, pero debido a su alta toxicidad y efectos negativos en el ambiente y la salud, se ha reducido su uso ligado a su prohibición en una gran mayoría de los países del mundo (Vega, 2008; Rojas-Cabezas, 2016). Sin embargo, ese no es el caso de todas las familias de plaguicidas y algunos de los que más se utilizan en la actualidad son los que pertenecen a las familias de los organofosforados o las triazinas (Ramírez y Lacasaña, 2001).

1.2.1. Organofosforados

Los plaguicidas de esta familia se caracterizan por ser ésteres, amidas o tioles derivados de ácido fosfórico; su estructura básica se observa en la figura 1. Los grupos de cadena lateral (-R) usualmente corresponden a grupos alquilo o arilo que pueden estar unidos directamente al fósforo o a través de un átomo de oxígeno o de azufre, en este segundo caso se llaman fosfonatos o tiofosfonatos respectivamente. Las fosforoamidas se forman cuando un carbono se encuentra unido al fósforo a través de un grupo -NH. Por su parte X podría ser ocupado por un amplio rango de grupos químicos por ejemplo, grupos alifáticos, aromáticos o heterocíclicos, unidos al átomo de fósforo a través de un grupo lábil o saliente que usualmente es un átomo de oxígeno o azufre (Ballantyne y Marrs, 1992; Sogorb y Vilanova, 2002).

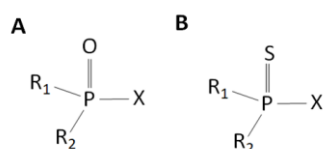


Figura 1. Estructura general de los plaguicidas organofosforados. **A.** Fosfato. **B.** Fosforotioato.

A nivel mundial esta familia de plaguicidas se utiliza como insecticidas y nematicidas, y representan una de las familias de plaguicidas más utilizados actualmente, representando en el 2010 más de un 36 % del mercado global (Ghosh et al., 2010). En Costa Rica, al igual que a nivel mundial, los insecticidas en general son los segundos agroquímicos más utilizados, superados únicamente por los herbicidas (Grube et al., 2011; Ramírez et al., 2009; Ramírez, 2010), y algunos de ellos, por ejemplo el clorpirifós que es uno de los más ampliamente utilizados, se han encontrado en valores cuantificables en muestras de agua y sedimento en Costa Rica (Alfaro, 2011; Carazo-Rojas et al., 2018).

Algunos representantes de esta familia de plaguicidas son el clorpirifós recientemente mencionado, el metamidofós, el cadusafós, el monocrotofós, entre otros. Todos ellos son distribuidos y utilizados en Costa Rica y se ha reportado que sus vidas medias en el campo van desde los 1.4 días hasta los 39 días (Lewis et al., 2016) como se muestra en el cuadro 1. En la figura 2 se observa la estructura química de estos plaguicidas.

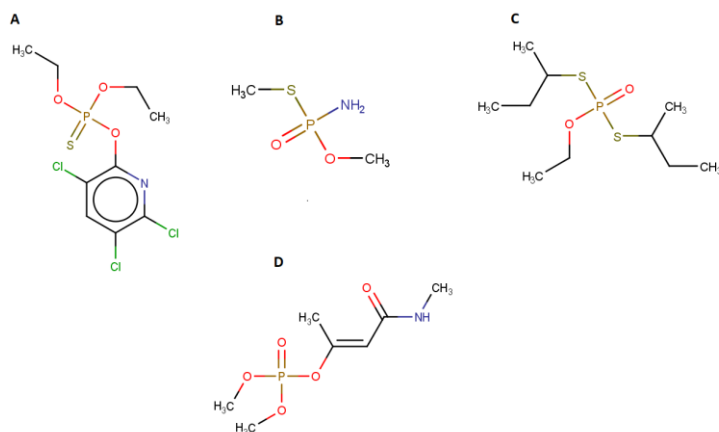


Figura 2. Estructura química de algunos plaguicidas organofosforados. A. Clorpirifós. B. Metamidofós. C. Cadusafós. D. Monocrotofós (Elaborados con MarvinSketch® y Chemicalize®).

Cuadro 1. Características de algunos plaguicidas de uso en Costa Rica. (Tomado de University of Hertfordshire y Servicio Fitosanitario del Estado) (Lewis et al., 2016; SFE, 2017).

Plaguicida	Nombre IUPAC	Tipo de plaguicida	Solubilidad (mg L ⁻¹ a 20°C)	Degradación en campo (DT ₅₀ dado en días)	Uso permitido en Costa Rica según SFE (SFE, 2017)
Clorpirifós	Dietoxi-sulfanilideno-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)oxi-lambda5-fosfano	Insecticida/ organofosforado	1.05	21	Caña de azúcar, piña, papa, maíz, algodón, arroz, café, chile dulce, sorgo, tomate, banano, plátanos.
Metamidofós	[Amino(metilsulfanil)fosforil]oximetano	Insecticida, acaricida/ organofosforado	200 000	4	Algodón, melón, papa, pepino, tabaco, tomate, sandía, repollo, ornamentales.
Cadusafós	2-[butano-2-ilsulfanil(etoxi)fosforil]sulfanilbutano	Insecticida, nematicida/ organofosforado	245	39	Banano, plátanos, piña.

Monocrotofós	Dimetil [(E)-4-metilamino-4-oxobut-2-en-2-il] fosfato	Insecticida, acaricida/ organofosforado	818 000	30	Algodón, caña de azúcar, papa, café, cítricos, maíz, tabaco.
Atrazina	6-cloro-4-N-etil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Herbicida/ triazina	35	29	Caña de azúcar, maíz, sorgo, piña,
Ametrina	4-N-etil-6-metilsufanil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Herbicida/ triazina	200	37	Caña de azúcar, piña, banano, plátanos, maíz, cítricos,
Terbutilazina	2-N- tert-butil-6-cloro-4-N-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Herbicida/ triazina	6.6	22.4	Maíz, sorgo, ornamentales, café
Terbutrina	2-N-tert-butil-4-N-etil-6-metilsufanil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Herbicida/ triazina	25	52	Caña de azúcar, ornamentales

El modo en que actúan los organofosforados es mediante la inhibición de la degradación de acetilcolina, un importante neurotransmisor involucrado en la transmisión de impulsos nerviosos en el cerebro y músculo esquelético principalmente. Una vez que ha cumplido su función, la acetilcolina debe ser hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa para evitar una sobreestimulación en el sistema nervioso; este es el paso que se ve inhibido en presencia del compuesto organofosforado (Pope et al., 2005; Singh y Walker, 2006).

De esta forma causan toxicidad en insectos y mamíferos provocando parálisis, convulsiones y finalmente la muerte de su objetivo blanco. Sin embargo, otros vertebrados e invertebrados también pueden sufrir efectos tóxicos al entrar en contacto con estas sustancias (Galloway y Handy, 2003).

1.2.2. Triazinas

La familia de plaguicidas triazinas son utilizados como herbicidas alrededor del mundo, y como se mencionó anteriormente, los plaguicidas utilizados para combatir malezas son los que poseen mayores índices de importación en el país y son los de mayor demanda a nivel global (Grube et al., 2011; Ramírez et al., 2009; Ramírez, 2010).

Químicamente se caracterizan porque en su estructura central poseen un anillo heterocíclico en el que tres carbonos fueron sustituidos por átomos de nitrógeno como se observa en la figura 3. Según la distribución de sus cadenas laterales además se clasifican en tres grupos, triazinas simétricas, las cuales se subdividen en metoxitriazinas, clorotriazinas o metiltiotriazinas según sus grupos sustituyentes; triazinas no simétricas o triazinonas, y hexazinonas también llamadas triazindionas (Sabik et al., 2000). La atrazina, una triazinona, es uno de los representantes de esta familia más ampliamente utilizado en muchos países, incluido Estados Unidos, mientras que en otros ya ha sido prohibido su uso debido en gran parte a su susceptibilidad de lixiviación (EPA, 2013). La estructura de algunos representantes de esta familia se puede ver en la figura 4, y el detalle de algunas de sus principales características se muestra en el cuadro 1.

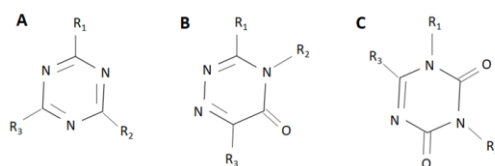


Figura 3. Estructura química general de los plaguicidas triazinas. A. Triazina. B. Triazinona. C. Hexazinona

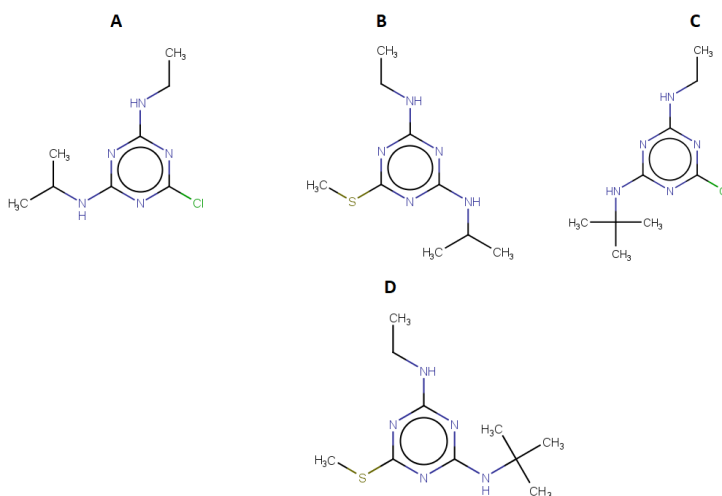


Figura 4. Estructura química de algunos plaguicidas de la familia de las triazinas. A. Atrazina. B. Ametrina. C. Terbutilazina. D. Terbutrina. (Elaborados con MarvinSketch® y Chemicalize®).

La forma en que actúan estos plaguicidas y en general la mayoría de los herbicidas es mediante la inhibición de la fotosíntesis. En el caso de las triazinas el bloqueo se da al inhibir el transporte de electrones en el fotosistema II (Mets y Thiel, 1989).

1.3. Sistemas de Biopurificación de Plaguicidas

Con el fin de mitigar el ya conocido efecto negativo de los plaguicidas en el ambiente, se han desarrollado estrategias que contribuyan a disminuir este problema. Tal es el caso de los sistemas de biopurificación de plaguicidas (SBP). Estos ofrecen una opción sencilla y de bajo costo que permite utilizar materiales de desecho y de fácil acceso para los productores agrícolas, a la vez que favorecen la degradación microbiológica de sustancias complejas como los plaguicidas (Rodríguez-Rodríguez et al., 2013).

El SBP o *biobed*, como también es conocido, con su diseño original nace en Europa durante los años 90 y consta de tres componentes, una capa de arcilla, una capa de biomezcla y una capa de pasto, contenidos en una construcción simple tipo excavación similar a la que se muestra en la figura 5, que tiene como objetivo contener las sustancias a degradar y evitar que lleguen al ambiente (Castillo et al., 2008). Se ha demostrado que utilizando estos sistemas con algunas modificaciones en su diseño, pueden llegar a reducir las concentraciones de plaguicida hasta en un 98% en las aguas contaminadas (Cooper et al., 2016; Karas et al., 2016).

La biomezcla es una matriz biológicamente activa, y es quien contribuye mayoritariamente a la degradación. Está compuesta por suelo, un componente de alto contenido húmico y un material lignocelulósico en las proporciones volumétricas originales de 25:25:50 respectivamente (Chin-Pampillo et al., 2015a; Karanasios et al., 2012a). Sin embargo, Chin-Pampillo y colaboradores en el 2015 demostraron que estos componentes en una proporción volumétrica de 42:13:45 respectivamente, favorecen la degradación de plaguicidas como el carbofurán y la reducción de la toxicidad residual de la matriz (Chin-Pampillo et al., 2015b).

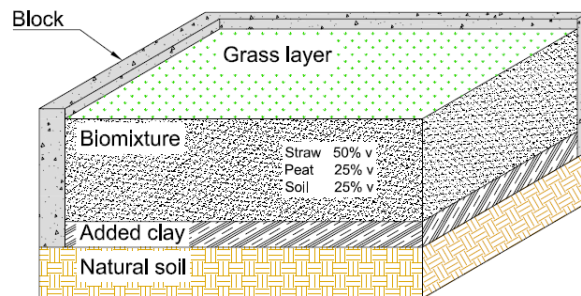


Figura 5. Representación esquemática del diseño original de un SBP (Tomado de Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013).

Cada componente en la biomezcla cumple un papel diferente. El suelo, que debe ser preferiblemente proveniente de la misma finca donde va a ser utilizado el SBP, con el fin de que haya sido preexpuesto a los plaguicidas de uso frecuente en esta, aporta microorganismos con capacidad degradativa y adicionalmente colabora con la capacidad de adsorción del sistema (Sniegowski *et al.*, 2011). El componente de alto contenido húmico puede ser turba o compost y también contribuye a la capacidad de adsorción, la cual a su vez varía para cada plaguicida según sus características químicas; este componente de la biomezcla, además puede aportar microorganismos que participan en la degradación de plaguicidas y ayuda al control de la humedad (Castillo *et al.*, 2008; Fogg *et al.*, 2003a), y finalmente el material lignocelulósico favorece la colonización de hongos ligninolíticos y potencia su actividad enzimática, ideal para la degradación de contaminantes orgánicos (Rivero *et al.*, 2016); otro aporte de este sustrato es liberar moléculas más simples a partir de la ruptura de la lignina, y que sirven como nutrientes para los demás microorganismos presentes en la biomezcla (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2013). Algunos materiales con estas características ya han sido probados en los biobeds tal es el caso del bagazo de caña, la fibra de coco, la granza de arroz, entre otros (Coppola *et al.*, 2007; Vischetti *et al.*, 2008; Chin-Pampillo *et al.*, 2015a).

Aún restan por evaluar a fondo otros factores que podrían afectar la efectividad de la depuración realizada por los SBP, como la presencia y co-aplicación de antimicrobianos de uso agrícola. Recientemente Huete-Soto y colaboradores en el 2017, reportaron que la presencia de oxitetraciclina (OTC) en la biomezcla de un SBP estimuló su respiración y aceleró levemente las tasas de mineralización de clorpirifós, sin embargo, de tres

herbicidas probados, la degradación de uno de ellos fue significativamente inhibida (Huete-Soto et al., 2017a) por lo que son necesarios más estudios que clarifiquen este tema y que se complementen con estudios genéticos para alcanzar una mejor comprensión de los procesos que se llevan a cabo en los SBP.

1.4. Degradación bacteriana de organofosforados y triazinas

Las bacterias son capaces de llevar a cabo diversos procesos metabólicos y establecerse en un elevado número de sustratos. Esto entre otras causas ha llevado al uso de técnicas de cuantificación en medios selectivos para estudiar las capacidades de crecimiento específicas, entre ellas la técnica del Número Más Probable (NMP), con la cual es posible obtener una estimación de la cantidad de microorganismos en una muestra con capacidad de metabolizar contaminantes, como los plaguicidas (Woomer, 1994). Además, gracias a características como sus cortos tiempos de generación, sus altas tasas de mutación y la elevada plasticidad genómica que caracteriza a las bacterias, es que estas se adaptan fácilmente a diferentes ambientes y condiciones, desarrollando diversos mecanismos para sobrevivir, multiplicarse y utilizar o degradar casi cualquier compuesto orgánico (Johnson y Spain, 2003; Verhagen et al., 2015).

La manera en que las bacterias del suelo adquieren sus fenotipos degradadores involucra procesos para el reclutamiento de los genes necesarios y su distribución por transferencia horizontal de genes (Monard et al., 2013). Posteriormente, la selección natural se encarga de elegir y mantener las poblaciones bacterianas con mejores recursos para vivir en estos ambientes y ya se han descrito genes estrechamente relacionados con la capacidad bacteriana de degradar plaguicidas de una familia específica (Rousidou et al., 2016).

1.4.1. Degradación de organofosforados (OP)

La degradación bacteriana de los organofosforados es un evento que le brinda ventajas al microorganismo en cuestión, ya que posterior a su mineralización o degradación el plaguicida le sirve como fuente de fósforo y/o carbono (Meleiro-Porto et al., 2011). Esta degradación está mediada principalmente por enzimas que liberan el grupo saliente del átomo de fósforo y catalizan reacciones de hidrólisis, oxidación, alquilación y desalquilación (Sogorb y Vilanova, 2002; Singh et al., 1999).

Las enzimas con actividad fosfotriesterasa son importantes porque se encargan de realizar la primera fase en el proceso de detoxificación, todas actúan a través de la hidrólisis del enlace fosfoéster del grupo saliente dejando libre un fosfodiéster y un alcohol (Singh y Walker, 2006). Se clasifican en hidrolasas de organofosforados (OPH), anhidrolasas ácidas de organofosforados (OPAA) y metilparatión hidrolasas (MPH) (Singh et al., 1999). Por ser enzimas fundamentales en los procesos de degradación de OP, el estudio de los genes que las codifican brinda un primer acercamiento en el conocimiento del potencial degradador de una comunidad o cepa específica.

Algunos de los genes que se han identificado que tienen relación con la actividad bacteriana degradadora de OP son el gen *opd* (organophosphate-degrading) que codifica por la enzima OPH, el gen *opdA* que codifica por la enzima OPDA y es una variante de la enzima OPH, el gen *mpd* que codifica por la enzima MPH, y el gen *opaA* el cual codifica por la enzima OPAA. (Cheng et al., 1996; Singh, 2008). El origen de estas enzimas no está del todo claro, pero se cree que la OPH se origina por la promiscuidad en la actividad de la lactonasa (Singh, 2008).

De estas enzimas la OPH se ha encontrado en diferentes géneros de bacterias, entre ellas *Brevundimonas diminuta* y *Flavobacterium* spp., además se ha encontrado que tiene una amplia especificidad de sustratos y capacidad para romper enlaces P-O, P-CN, P-F y P-S, este último enlace es importante porque no hay otra enzima que se conozca con capacidad de romperlo (Cheng y DeFrank, 2000).

El gen *opd* se codifica en plásmidos diferentes según la especie (pPDL2 y pCMS1) con una región altamente conservada de aproximadamente 5.1 kb, y ha sido encontrado en diferentes regiones del mundo (Siddavattam et al., 2003). Por otro lado, la enzima por la que codifica el gen *opdA*, a diferencia del *opd*, no está codificado en un plásmido sino en el cromosoma pero las proteínas correspondientes cuentan con un 90% de homología de aminoácidos y comparten la estructura secundaria (Horne et al., 2002).

1.4.2. Degradación de triazinas

En el caso de las triazinas se ha reportado que su degradación biológica incluye una serie de pasos multienzimáticos, en su mayoría hidrolíticos, que inician con la formación de

hidroxiatrazina mediada por una deshalogenación (Krutz et al., 2010). La vía biodegradativa que mejor se conoce es Atz, descrita inicialmente en una cepa de *Pseudomonas* sp. y luego en otras bacterias ambientales (Martinez et al., 2001; Devers et al., 2004).

Esta vía involucra seis proteínas AtzA (atrazina clorohidrolasa), AtzB (hidroxiatrazina etilaminohidrolasa), AtzC (N-isopropilamelida isopropilaminohidrolasa), AtzD (ácido cianúrico hidrolasa), AtzE (biuret aminohidrolasa), AtzF (alofanato hidrolasa) (Cheng et al., 2005; Sagarkar et al., 2016; Douglass et al., 2016), sin embargo, no es la única y otros genes han sido implicados en vías degradativas de triazinas, e incluso en algunos casos codifican por productos similares a las enzimas de la vía Atz, estos genes son *trzN* (triazina hidrolasa) y *trzD* (ácido cianúrico hidrolasa) (Sajjaphan et al., 2004; Karns y Eaton, 1997) descritos en diferentes géneros de bacterias ambientales como *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Nocardioides* sp., entre otros (Mulbry et al., 2002; Eaton y Karns, 1991).

En los aislamientos ambientales se ha encontrado que lo que predomina son combinaciones de genes *atz* y *trz* trabajando en conjunto para lograr la mineralización de las triazinas tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Douglass et al., 2016; El Sebaï et al., 2011). Estos genes por lo general se han descrito ubicados en plásmidos, sin embargo, en el 2003 un grupo de investigadores reportó una cepa de *Arthrobacter* sp. que podría tener el gen *atzA* dentro del cromosoma, lo cual favorece su transmisión a las siguientes generaciones bacterianas (Cai et al., 2003).

1.5. Antibióticos de uso agrícola

Así como en las actividades agrícolas se utilizan los plaguicidas para controlar plagas de insectos, hongos y malezas, no es difícil pensar que también existen productos que combatan las enfermedades de los cultivos causadas por bacterias. Este es el caso de los antibióticos de uso agrícola.

Al igual que sucede con los plaguicidas, el uso inadecuado de estas sustancias es un tema que merece atención desde el punto de vista de contaminación. El uso excesivo o la disposición inadecuada de sus residuos son capaces de acarrear o empeorar problemáticas

de resistencia a los antimicrobianos tanto en humanos como en los ecosistemas, además del problema de contaminación (Thiele-Bruhn y Beck, 2005).

En Costa Rica es reducido el número de antibióticos utilizados en las actividades agrícolas, entre ellos se pueden mencionar la estreptomicina, la oxitetraciclina y la kasugamicina, sin embargo, son al menos 18 cultivos diferentes, muchos de ellos productos de la canasta básica, los que utilizan antibióticos (Gobierno de la República, 2018). La oxitetraciclina es uno de los antibióticos más utilizado en el sector agrícola, pertenece a la familia de las tetraciclinas, es producido por *Streptomyces rimosus* y su efecto bacteriostático lo efectúa bloqueando la síntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos (Stockwell y Duffy, 2012; O'Neil, 2006). En Costa Rica su uso está autorizado para los cultivos de aguacate, cacao, café, cebolla, frijol, tabaco, banano, plátanos, ajonjolí, soya, papa, arroz, manzana, pera y ornamentales, en dosis cercanas a 1 g del ingrediente activo por litro de mezcla de aplicación (SFE, 2017). Desafortunadamente la regulación y monitoreo de su uso a nivel agrícola no se hace en el país, y se estima que las cantidades de esta sustancia para este fin específico no son para nada despreciables (Rodríguez-Sánchez, 2008).

En el contexto de los SBP, se ha mencionado que el mayor potencial biodegradador es aportado por los microorganismos del suelo, principalmente bacterias. Además, ya que el uso que reciben ambas sustancias (plaguicidas y antibióticos) es similar, es posible que coexistan en el SBP, por lo cual el estudio de este escenario cobra importancia. Hasta el momento los resultados obtenidos de la interacción antibiótico-plaguicida en los SBP sugieren que ambas sustancias podrían descartarse en conjunto en estos sistemas, sin embargo, para concluir adecuadamente son necesarios más estudios (Castillo-González et al., 2017; Huete-Soto et al., 2017a).

Conociendo el panorama general del uso de plaguicidas, especialmente triazinas y organofosforados, y las ventajas que los SBP representan en el manejo de sus residuos, nace el cuestionamiento de si realmente existe un efecto negativo en la degradación de estas familias de plaguicidas en un SBP, donde, además, se tratan diferentes concentraciones de oxitetraciclina, y si este efecto correlaciona con la expresión de genes bacterianos en el SBP.

2. Justificación

Las actividades asociadas a la producción agrícola, a pesar de traer numerosos beneficios en cuanto a rendimiento y control de la producción, en muchos casos contribuyen a la contaminación ambiental. Los plaguicidas representan uno de los principales contaminantes derivados de esta actividad económica (Castillo et al., 2008).

Dentro de este contexto los SBP son una solución sencilla y económica para dar un manejo adecuado a los residuos de plaguicidas provenientes de las actividades de carga, preparación, dispersión y descarte de estos agentes químicos, evitando o disminuyendo su llegada a otros compartimentos ambientales (Karanasios et al., 2012b).

Sin embargo, es necesario considerar que el comportamiento de los SBP debe ser ampliamente evaluado ya que existen diversas variables según cada región, los plaguicidas que se utilizan y las cantidades de estos que podría recibir el SBP, las poblaciones microbianas presentes en la biomezcla encargadas de la degradación, la expresión de genes específicos involucrados en los procesos degradativos, y la coexistencia de otras sustancias de uso agrícola en el SBP que podrían alterar las comunidades bacterianas y consecuentemente la degradación y eficiencia del SBP (Rivero et al., 2016).

Hasta la fecha existe poca información acerca del efecto que los antibióticos de uso agrícola provocan en la población bacteriana y el potencial degradador de las biomezclas en un SBP, en los que simultáneamente se está dando la degradación de mezclas complejas de plaguicidas. Técnicas moleculares que permitan evaluar y monitorear en el tiempo el comportamiento de genes bacterianos involucrados con los procesos de degradación de plaguicidas, sumado a análisis que de manera simultánea monitoreen la degradación de cada plaguicida, pueden contribuir a disminuir el vacío de conocimiento en este campo y facilitar la comprensión de los procesos microbiológicos que participan en los SBP, con el fin de modificar adecuadamente los sistemas, de modo que el rendimiento de biodepuración mejore o bien, no se vea disminuido.

3. Hipótesis

La degradación de plaguicidas organofosforados y triazinas en un sistema de biopurificación de plaguicidas (SBP) se reduce en presencia de oxitetraciclina y está relacionada a una menor cuantificación de genes bacterianos involucrados en la degradación de plaguicidas.

4. Objetivo General

Analizar el efecto de la oxitetraciclina en la degradación de plaguicidas organofosforados y triazinas a nivel de laboratorio en una biomezcla para la degradación de plaguicidas.

4.1. Objetivos Específicos

- 4.1.1. Determinar la cinética de eliminación de plaguicidas seleccionados de las familias organofosforados y triazinas, en una biomezcla de SBP en ausencia y en presencia de oxitetraciclina para determinar su efecto sobre la tasa de eliminación de los plaguicidas.
- 4.1.2. Monitorizar los cambios en la toxicidad residual de la biomezcla durante el tratamiento de organofosforados y triazinas en co-aplicación con oxitetraciclina, para relacionar la tasa de eliminación con los efectos ecotoxicológicos de la biomezcla tratada y estimar su aplicabilidad en el ambiente.
- 4.1.3. Determinar la variación en la cuantificación de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas durante su eliminación en la biomezcla, para correlacionar este parámetro con las tasas de eliminación de los plaguicidas en presencia de oxitetraciclina.
- 4.1.4. Cuantificar los microorganismos viables en la biomezcla con capacidad de degradar un representante de las triazinas y uno de los organofosforados, para estimar la población microbiana involucrada en los procesos degradativos de triazinas y organofosforados en la matriz.

5. Estrategia metodológica

Por medio de ensayos de degradación se evaluó la capacidad de una biomezcla para eliminar 4 triazinas: atrazina (ATZ), ametrina (AMT), terbutilazina (TBZ) y terbutrina (TBT) y 4 organofosforados: clorpirifós (CLP), cadusafós (CDF), metamidofós (MTM), y monocrotofós (MNC). La cinética de eliminación se determinó tanto en ausencia como en presencia de OTC. Los ensayos consistieron en triplicados de tres condiciones o tratamientos en una biomezcla, además de un sistema sin tratamiento que funcionó como control. Los tratamientos consistieron en: a) una mezcla de plaguicidas organofosforados y triazinas a altas concentraciones, b) la misma mezcla de plaguicidas más el antibiótico OTC en una concentración alta (10 mg kg^{-1}) respecto a las dosis de aplicación recomendadas y c) nuevamente esta mezcla de plaguicidas más el antibiótico a una concentración aún más alta (50 mg kg^{-1}); ambas concentraciones de OTC corresponden a posibles escenarios encontrados en una biomezcla, de acuerdo con el uso del antibiótico. La concentración de los plaguicidas y la OTC se cuantificó en cada sistema a lo largo de un período de 60 días utilizando LC-MS/MS; la determinación de las vidas medias en cada caso, permitió la comparación de los diferentes tratamientos. Adicionalmente, se realizaron ensayos de toxicidad aguda (inmovilización de *Daphnia magna*) y fitotoxicidad (germinación de *Lactuca sativa*) durante el tratamiento, con el fin de no solo evaluar la degradación, sino también el efecto tóxico residual en la biomezcla, ya que los productos intermedios de la degradación también podrían ser tóxicos. La evaluación de la fitotoxicidad resulta relevante ya que gran parte de los plaguicidas agregados son herbicidas. Además, para tener un panorama más amplio del proceso de degradación, se emplearon las técnicas de PCR y qPCR para efectuar estudios de cuantificación de los genes *opd* y *atzA* involucrados en los procesos degradativos de organofosforados y triazinas. Por último, se realizaron ensayos de NMP para obtener una estimación de la cantidad de microorganismos en la biomezcla con capacidad para degradar atrazina (ensayo de variación de potencial redox) y clorpirifós (ensayo de mineralización de ^{14}C -clorpirifós) en representación de cada familia de plaguicidas: triazinas y organofosforados.

6. Materiales y métodos

6.1. Reactivos, materiales y equipo

6.1.1. Reactivos químicos

Estándares analíticos de clorpirifós ((dietoxi-sulfanilideno-(3,5,6-tricloropiridin-2-il)oxi-lambda5-fosfano), 99.5 %), metamidofós ([amino(metilsufanil)fosforil]oximetano, 99.5 %), cadusafós (2-[butano-2-ilsufanil(etoxi)fosforil]sulfanilbutano, 97.2 %), monocrotofós (dimetil [(E)-4-metilamino-4-oxobut-2-en-2-il] fosfato, 99.5 %), atrazina (6-cloro-4-N-etil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina, 99.0 %), ametrina (4-N-etil-6-metilsufanil-2-N-propan-2-il-1,3,5-triazina-2,4-diamina, 98.0 %), terbutilazina (2-N-tert-butyl-6-cloro-4-N-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, 98 %), terbutrina (2-N-tert-butyl-4-N-etil-6-metilsufanil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, 100 %) y oxitetraciclina ((4S,4aR,5S,5aR,6S,12aR)-4-dimetilamino-1,5,6,10,11,12a-hexahidroxi-6-metil-3,12-dioxo-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-2-carboxamida, 99 %) se obtuvieron de Chem Service (West Chester, Pennsylvania, USA). Los plaguicidas formulados de clorpirifós (Solver[®] 48SC, 48 g/100 mL), atrazina (Atranex[®] 90WG, 90 g/100 g), ametrina (Agromart[®] Ametrina 50SC, 50 g/100 mL), terbutilazina (Terbusol[®] 50SC, 50 g/100 mL), terbutrina (Terbutrex[®] 50SC, 50 g/100 mL) y oxitetraciclina (Terramicina Agrícola[®] 5WP, 5 g/100 g) se consiguieron de negocios locales. El clorpirifós radiomarcado (¹⁴C-CLP; [anillo-2,6-¹⁴C₂]-clorpirifós; 4.38×10^9 Bq g⁻¹; pureza radioquímica 98.99 %; pureza química 98.34 %) se obtuvo de Izotop (Institute of Isotopes Co., Budapest, Hungría). El hidróxido de potasio (grado analítico) se obtuvo de Merck (Darmstadt, Germany). El coctel para los análisis de centelleo líquido Ultima Gold se obtuvo de Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA). Los solventes y reactivos para extracción de los plaguicidas se detallan en Ruiz-Hidalgo et al. (2014).

6.1.2. Biomezcla

Una biomezcla que contiene fibra de coco, compost y suelo de una finca productora en Tierra Blanca de Cartago, en las proporciones volumétricas 45:13:42, respectivamente, almacenada a temperatura ambiente con humedad controlada, se utilizó para los ensayos

de degradación de plaguicidas, toxicidad aguda, fitotoxicidad, cuantificación por NMP y cuantificación génica.

6.1.3. Medio mínimo

La composición del medio mínimo utilizado en el ensayo de NMP por variación del potencial redox contiene (por litro) 0.5 g KH_2PO_4 , 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 10 mL de una solución de elementos traza que contiene (por litro de solución): 1 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.9 g CaSO_4 , 0.8 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g Na_2WO_4 , 0.02 g Na_2SeO_3 y 0.02 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Citrato en una concentración final de 15 mmol L^{-1} y succinato a una concentración final de 28 mmol L^{-1} fueron utilizados como fuentes de carbono. La atrazina (99.0 %) a una concentración final de 2 mmol L^{-1} se utilizó como única fuente de nitrógeno (Cook y Hütter, 1981).

6.2. Procedimientos experimentales

6.2.1. Ensayo de eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en la biomezcla a diferentes concentraciones de oxitetraciclina, ensayos toxicológicos y ensayos de cuantificación génica

Los ensayos de eliminación se llevaron a cabo en recipientes plásticos (17x11x9.5 cm) que contenían ~700 mL de biomezcla. Se prepararon tres tratamientos diferentes y un control, todos por triplicado. A todos los recipientes con biomezcla excepto a los controles se les agregó una mezcla de 8 plaguicidas: CLP, MTM, CDF, MNC, ATZ, AMT, TBZ y TBT, para que la concentración final en la biomezcla fuese de 50 mg kg^{-1} en el caso de ATZ, AMT, TBZ, TBT y CLP, de 6.8 mg kg^{-1} para el MTM y de 10 mg kg^{-1} para CDF. El primer tratamiento consistió únicamente en la biomezcla más la mezcla de plaguicidas, al segundo tratamiento se le agregó, además, una concentración de OTC de 10 mg kg^{-1} y 50 mg kg^{-1} para el tercer tratamiento. El contenido de todos los recipientes se homogenizó manualmente y se incubó en condiciones estáticas a 25°C hasta el final del ensayo; periódicamente se verificó de forma gravimétrica la pérdida de volumen y se les agregó agua para mantener un contenido de agua constante en la matriz. Se tomaron muestras de 5 g periódicamente (0, 4, 7, 11, 14, 28, 42, 60 días) durante un periodo de 60 días, considerado suficiente tomando en cuenta la vida media de degradación en campo de los

plaguicidas estudiados, para determinar la concentración remanente de cada plaguicida y de OTC (OTC no se determinó en las muestras del tratamiento que no contiene OTC) por LC-MS/MS. También se tomaron muestras de 2 g (0, 4, 7, 11, 14 y 28 días) para los ensayos de cuantificación génica y adicionalmente se tomó una muestra compuesta (100 g; 33.3 g por réplica) de cada tratamiento a los (7, 14, 28, 42 y 60 días) para realizar los ensayos ecotoxicológicos.

6.2.2. Ensayo de NMP para la cuantificación de degradadores de atrazina (NMP-TTC)

Un gramo de biomezcla preexpuesta a atrazina fue diluido en 9 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio (1.2 mmol L^{-1} , pH 7.0) y homogenizados, posteriormente se realizaron diluciones decimales seriadas y se trabajó con las diluciones 1.0×10^{-2} a 1.0×10^{-10} para ser utilizados como inóculo en el ensayo de NMP-TTC.

El ensayo se llevó a cabo según el método validado por Dinamarca y colaboradores (Dinamarca et al., 2007) en microplacas de 96 pozos. A cada pozo se le agregó 200 μL de una disolución de atrazina (2 mmol L^{-1}) en metanol, se dejó secar en condiciones de esterilidad por 5 días. Se añadió a cada pozo 45 μL de medio mínimo y 45 μL de cada respectiva dilución de biomezcla por quintuplicado. La microplaca se incubó por una semana a 25°C en cámara húmeda para evitar pérdidas por evaporación. Al final del periodo de incubación se añadió TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium), de manera que se alcanzara una concentración final en cada pozo de 0.01 mL L^{-1} , se incubó por 4 horas más a 25°C y antes de leer se agregó 100 μL de etanol para disolver precipitados que puedan interferir con la lectura. Se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro MultiSkan Sky[®] (Thermo Scientific), se consideraron positivos los pozos que superaron la absorbancia del blanco más 3 desviaciones estándar. La estimación de los microorganismos viables capaces de degradar atrazina se realizó según los cálculos establecidos por la FDA en el Manual de análisis bacteriológico (BAM) para la cuantificación de bacterias por NMP (Blodgett, 2010) y según lo descrito por Jarvis et al. (2010).

6.2.3. Ensayo de NMP por mineralización de ^{14}C -CLP para la cuantificación de degradadores de clorpirifós (NMP- ^{14}C)

Se realizaron diluciones decimales de la biomezcla con los diferentes tratamientos en solución amortiguadora de fosfato de sodio (1.2 mmol L^{-1} , pH 7.0), para esto se pesó 1 g de biomezcla y se añadieron 9 mL de la solución amortiguadora (dilución 1.0×10^{-1}), a partir de esta dilución se continuó con las demás diluciones decimales hasta la dilución 1.0×10^{-10} , todas con volumen final de 10 mL.

Para determinar el NMP de degradadores de CLP se midió la mineralización del ^{14}C -CLP a través de la producción de $^{14}\text{CO}_2$ en sistemas biométricos para cada dilución de la biomezcla. Se implementó el procedimiento descrito por Lehmicke y colaboradores (Lehmicke et al., 1979) modificado. Brevemente, los sistemas biométricos se construyeron utilizando viales de vidrio de 15 mL y 1.5 mL, los más pequeños se utilizaron como trampa para capturar el ^{14}C - CO_2 . Se tomaron 600 μL de cada una de las diluciones y se colocaron por quintuplicado en los viales de 15 mL. Posteriormente, a cada sistema se le añadió CLP hasta alcanzar una concentración final de 50 mg kg^{-1} en un volumen de 6 mL, 60 μL de CLP radiomarcado con ^{14}C ($1.0 \times 10^7 \text{ dpm}$) y se completó el volumen hasta 6 mL con solución amortiguadora de fosfatos. Finalmente, al sistema se le añadió el vial con 1.5 mL con 1.0 mL de KOH (0.25 mol L^{-1}) donde se capturó el ^{14}C - CO_2 producto de la mineralización del ^{14}C -CLP. Los sistemas se montaron a los días 0, 11 y 28 después de aplicar los diferentes tratamientos a la biomezcla. Todos los sistemas fueron incubados en la oscuridad a $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 30 días, cuando el KOH se retiró para medir su actividad. Quintuplicados de una muestra de solución amortiguadora sin ^{14}C -CLP, fueron utilizados como control negativo.

6.3. Procedimientos analíticos

6.3.1. Extracción y cuantificación de plaguicidas

La extracción de los plaguicidas organofosforados y triazinas se llevó a cabo utilizando una mezcla de agua y acetonitrilo acidificado (ácido fórmico 1 mL L^{-1}) tal como se describe en Ruiz-Hidalgo et al, 2014. La extracción de OTC se realizó según el método descrito en Jiménez-Gamboa et al., 2018. El análisis de los plaguicidas se hizo por LC-

MS/MS utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC-1290 Infinity LC, Agilent Technologies, CA) acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Agilent Technologies, modelo 6460). La separación cromatográfica se llevó a cabo a 40 °C inyectando 6 µL del extracto de la muestra en una columna Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 2.1 m i.d., tamaño de partícula 2.7 µm), y utilizando agua acidificada (ácido fórmico 0.1 mL L⁻¹, A) y metanol acidificado (ácido fórmico 0.1 mL L⁻¹, B) como fases móviles. Como estándar interno y estándar de recuperación se utilizó el linurón-d₆ y el carbofurán-d₃ respectivamente. Las transiciones seleccionadas, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) para los analitos se muestran en el cuadro 2. Las condiciones del detector del espectrómetro de masas que fue utilizado se describen en Chin-Pampillo et al. (2015b).

Cuadro 2. Transiciones seleccionadas y otros parámetros en la detección de organofosforados y triazinas en la biomezcla, utilizando el método de monitoreo dinámico de reacción múltiple (dMRM)

Compuesto	Transición		Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)	Tipo de transición	LOD (µg kg ⁻¹ biomezcla)	LOQ (µg kg ⁻¹ biomezcla)
	Ion precursor	Ion producto						
Ametrina	228	186	106	17	8.05	Q	45.5	88.8
		96		25		q		
Atrazina	216	174	106	17	9.45	Q	39.8	79.8
		96		25		q		
Terbutilazina	230	174	104	13	11.3	Q	34.9	68.6
		96		29		q		
Terbutrina	242	186	96	17	9.8	Q	41.9	81.9
		91		29		q		
Clorpirifós	350	97	90	30	15.74	Q	64.3	124.2
		198		15		q		
Metamidofós	142	94	90	10	0.98	Q	41.9	82.1
		125		10		q		
Cadusafós	271	159	70	5	14.3	Q	66.5	128.8
		131		20		q		
Monocrotofós	224	127	62	13	1.85	Q	48.7	94.8
		193		5		q		

Linurón-d ₆	255	160	92	17	11.14	Q	-	-
(e.i.)		185		13		q		
Carbofurán-d ₃	225	165	86	9	7.67	Q	-	-
(e.s.)		123		21		q		

Q: transición de cuantificación, q: transición de confirmación.

e.i.: estándar interno; e.s.: estándar de recuperación.

LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación

Los datos por triplicado de las concentraciones de cada plaguicida y OTC se emplearon para determinar sus vidas medias de eliminación (DT_{50}). Primero se graficaron los datos y se buscó el modelo de mejor ajuste para la curva con el programa SigmaPlot 12.0 (San José, CA, USA). Las curvas se ajustaron a modelos de decaimiento exponencial o modelos sigmoidales de Gompertz; en cada caso se tomaron los parámetros de la curva y se utilizaron para calcular las respectivas DT_{50} según una cinética de primer orden (ecuación 1), en la que la DT_{50} no depende de la concentración inicial.

$$DT_{50} = \frac{\ln 2}{k} \quad (1)$$

Donde:

k = es la constante de decaimiento en las ecuaciones del modelo de decaimiento exponencial

En el caso de las curvas ajustadas al modelo de Gompertz, para calcular la DT_{50} se igualó la mitad del valor de la asíntota superior a la ecuación de Gompertz y se despejó x que corresponde al número de días.

Las vidas medias para cada plaguicida fueron comparadas en cada tratamiento calculando sus intervalos de confianza, para esto se utilizó el software SPSS Statistics 19 (IBM, Armonk, NY). En aquellos casos en que los intervalos de confianza no se traslaparon, se consideró que existe diferencia significativa entre los tratamientos.

6.3.2. Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

El ensayo de toxicidad aguda se llevó a cabo con el dáfido *Daphnia magna*. Se utilizaron elutriados preparados con las muestras de los ensayos de degradación como matriz analítica: Para preparar los elutriados se siguió el protocolo EPA-823-B-01-002 (EPA,

2001). Los ensayos ecotoxicológicos se realizaron por triplicado usando viales de vidrio de 25 mL de capacidad y agua moderadamente dura reconstituida sin vitamina B12 para las diluciones. Diez dáfidos neonatos (menos de 24 h) se colocaron en cada vial y se expusieron a 20 mL de las diluciones respectivas de los elutriados; posteriormente se incubaron en oscuridad a (23 ± 1) °C. A las 24 h y 48 h de exposición se contó el número de individuos muertos o inmovilizados. La CE_{50} (concentración a la cual se produce el 50 % de muerte en los individuos) se determinó utilizando el software TOXCALC – Toxicity Data Analysis Software (Tidepool Scientific Software, CA, USA), y los resultados de toxicidad se expresaron como unidades de toxicidad (TU), calculadas de acuerdo a la expresión: $TU = (CE_{50})^{-1} \times 100$.

6.3.3. Ensayo de fitotoxicidad con *Lactuca sativa*

La fitotoxicidad de cada matriz se evaluó por medio de ensayos de germinación con lechuga (*Lactuca sativa* var. Georgia). La germinación relativa de las semillas (GS) y la elongación relativa de la raíz (ER) se determinaron utilizando diez semillas expuestas a los elutriados durante seis días de incubación a 22 °C, usando las ecuaciones (2) y (3). Estos parámetros se determinaron por comparación con controles de germinación obtenidos de la exposición a agua destilada bajo las mismas condiciones. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y el índice de germinación (IG) se calculó de acuerdo a la ecuación (4).

$$GS = \frac{\text{semillas germinadas}}{\text{semillas germinadas en el control}} \times 100 \quad (2)$$

$$ER = \frac{\text{longitud promedio de la raíz}}{\text{longitud promedio de la raíz en el control}} \times 100 \quad (3)$$

$$IG = \frac{(GS) \times (ER)}{100} \quad (4)$$

6.3.4. Determinación $^{14}\text{CO}_2$ del ensayo de ^{14}C -NMP

A 8 mL de coctel de centelleo líquido se le agregó un alícuota de 1 mL proveniente de las muestras de KOH recolectadas de los sistemas biométricos, se homogenizó y la actividad del ^{14}C se midió por centelleo líquido utilizando el equipo Beckman LSC6000SC. Se calculó el promedio de la medición de los controles negativos + 2 desviaciones estándar y se utilizó como criterio para definir los viales positivos. La estimación de los

microorganismos viables capaces de degradar clorpirifós se realizó según los cálculos establecidos por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) en el Manual de análisis bacteriológico (BAM) para la cuantificación de bacterias por NMP (Blodgett, 2010) y según lo descrito por Jarvis et al. (2010).

6.4. Análisis de expresión de genes de degradación de organofosforados y triazinas

6.4.1. Extracción de ADN total

El ADN total fue extraído a partir de las muestras de biomezcla almacenada a 25 °C utilizando el kit NucleoSpin™ Soil (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluso para seleccionar el *buffer* de lisis más adecuado para realizar la extracción. La cuantificación del ADN obtenido se hizo midiendo la absorbancia a 260 nm en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y en el fluorómetro Quantifluor dsDNA System (Promega) para estandarizar la cantidad de ADN que se utilizó en el qPCR. La integridad del ADN, además, fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 50 pb (Thermo Fisher). Los productos de ADN fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

6.4.2. PCR punto final

Se utilizó el master mix DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) a una concentración final de 1X y los imprimadores del cuadro 3 a una concentración final del 0.4 µM, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó agua libre de nucleasas como control de PCR y ADN de una cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control positivo para la amplificación del gen del ARNr 16S, presente en todas las bacterias, por lo que es utilizado como control de amplificación. Se prepararon 25 µL de mezcla de reacción, la cual fue incubada en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) a 95 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min, y por último 5 minutos a 72 °C para la terminación de la reacción de síntesis. Los productos de PCR se congelaron a -20 °C hasta que se corrieron en un gel de agarosa a concentración de 2 g/100 mL utilizando el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific).

6.4.3. Obtención de controles positivos para el qRT-PCR

Debido a que los genes en estudio corresponden a genes muy específicos de degradación de plaguicidas, no se contaba con cepas aisladas positivas para los genes de interés. Por lo tanto, para obtener los controles positivos se siguió el procedimiento de Smith et al. (2006) modificado. Brevemente, se utilizaron los imprimadores para obtener productos de PCR con los genes de interés proveniente de la biomezcla, para utilizarlos como controles positivos. A falta de cepas tipo, estos controles permitieron confirmar que los amplicones en las muestras tuvieron el mismo tamaño que los generados con el control, obteniendo así resultados preliminares que podrían ser confirmados más adelante con secuenciación. Una vez obtenido el ADN, se corrió un gel de agarosa a concentración de 2 g/100 mL, se cortaron las bandas de cada gen y se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El producto purificado, se cuantificó con el fluorómetro Quantifluor dsDNA System (Promega) y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

6.4.4. PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR)

Se prepararon disoluciones de ADN de $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$ para los ADN obtenidos, los que se utilizarían como controles y los correspondientes a las muestras. El qRT-PCR se llevó a cabo utilizando un equipo QuantStudio 3 Real Time PCR (ThermoFisher Scientific). Las reacciones se llevaron a cabo en placas de reacción de 96 pozos MicroAmp (Applied Biosystems) y utilizando el Master mix PowerUp SYBR Green (Applied Biosystems) con un volumen total de reacción en cada pozo de $10\text{ }\mu\text{L}$ que contenga $5\text{ }\mu\text{L}$ del master mix, $1\text{ }\mu\text{L}$ del ADN, el cuál fue previamente normalizado a una concentración de $10\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) del *forward primer*, $0.5\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) del *reverse primer*, y $3\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Para realizar las amplificaciones se utilizaron las siguientes temperaturas, una incubación inicial a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min y 2 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido de 45 ciclos de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s y $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min; en este punto es donde se colectaron los datos. Finalizados los ciclos, se hizo una incubación a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min y finalmente $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 s. La lista de los imprimadores utilizados se muestra en el cuadro 3. Se verificó con las curvas de melting que el punto más alto en la curva obtenida de las muestras coincidiera con el punto más alto de la curva de melting de los controles. La interpretación de los resultados obtenidos se realizó utilizando el método comparativo de Ct ($\Delta\Delta\text{CT}$), según lo descrito por el fabricante (Applied Biosystems, 2008)

con el cual se determina la cantidad relativa de la secuencia objetivo en las muestras con respecto a la abundancia total de bacterias, medida a través de la expresión del ADN que codifica para un gen de referencia *housekeeping*, por ejemplo, el ARN ribosomal (región 16S). Brevemente, se calculó el ΔCT con la siguiente ecuación

$$\Delta CT = \bar{x}_{CT \text{ del GHK por día}} - CT_{GI} \quad (5)$$

Donde:

GHK = gen *housekeeping*

GI = gen de interés

Posteriormente se determinó el $\Delta\Delta CT$ con la ecuación (6) y el cambio en el incremento o fold change con la ecuación (7)

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_i - \Delta CT_f \quad (6)$$

Donde:

i = tratamiento inicial a comparar

f = tratamiento final a comparar

$$CI: 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (7)$$

Donde:

CI = cambio en el incremento de la muestra con tratamiento final respecto a la muestra con tratamiento inicial

Para una mayor fiabilidad en los resultados, se utilizaron diferentes genes de referencia *housekeeping*: dos pares de imprimadores para el 16S y uno del 23S para calcular la abundancia relativa de bacterias. Los datos de pendiente y eficiencia para cada uno de los genes *housekeeping* se puede consultar en la sección de anexos.

Cuadro 3. Secuencias de los imprimadores utilizados para los ensayos de expresión.

Gen	Imprimador	Secuencia	Referencia
<i>16S Wang</i>	16S F	CAATGGACGAAAGTCTGACG	Wang et al., 2016
	16S R	ACGTAGTTAGCCGTGGCTTT	Wang et al., 2016
<i>16S Monard</i>	16S (341) F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Monard et al., 2013
	16S (515) R	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Monard et al., 2013
23S	23S (2069) F	GACGYAAAGACCCCRTG	Hunt et al., 2006
	23S (2241) R	ACCGCCCCAGTHAAACT	Hunt et al., 2006
<i>atzA</i>	<i>atzA</i> 1F	GTGGCGGTGAGGTTGTATTG	NA
	<i>atzA</i> 1R	ACCTCACCATAGACCGCCAT	NA
<i>atzD</i>	<i>atzD</i> 1F	CTCGCTACAGAAGAGGTGCC	NA
	<i>atzD</i> 1R	GTTGTGCTCCAGTTCGATGC	NA
<i>opd</i>	<i>opd</i> 2F	AAGGCTGTGAGAGGATTGCG	NA
	<i>opd</i> 2R	CGCGAAACCTCGGCCAATAA	NA
<i>opdA</i>	<i>opdA</i> 1F	TACTCGGTCGTGGCAAACAA	NA
	<i>opdA</i> 1R	AAAACCCGAACAGCCAGTCA	NA

7. Resultados

7.1. Eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en presencia de oxitetraciclina

Se evaluó la eliminación de las triazinas ATZ, AMT, TBT y TBZ y los organofosforados CLP, MNC, MTM y CDF en la biomezcla, a la que, además, se añadió OTC a diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7 y en el cuadro 4. Los organofosforados alcanzaron disminuciones en su concentración de aproximadamente un 90 % al día 11, manteniéndose casi invariable hasta el final del experimento (Figura 6), únicamente con excepción del CDF (eliminación de menos del 45 % al día 60). En el caso del CLP y el CDF, se observó un retraso en su eliminación hasta el día 7 del ensayo, no así en el MTM y en el MNC. El CDF fue el que presentó una mayor persistencia en la biomezcla durante el tiempo del ensayo; a pesar de esto logró eliminarse de la biomezcla en el mismo periodo que los demás plaguicidas, hasta en un 40.8% en ausencia de OTC, un 35.3% (B+M+OTC10) y un 43.3% (B+M+OTC50). Las DT_{50} de los organofosforados en la biomezcla están por debajo de los dos días, a excepción del cadusafós, cuyas DT_{50} fueron de 61.3 d (B+M), 59.2 d (B+M+OTC10) y 56.8 d (B+M+OTC50) (Cuadro 4).

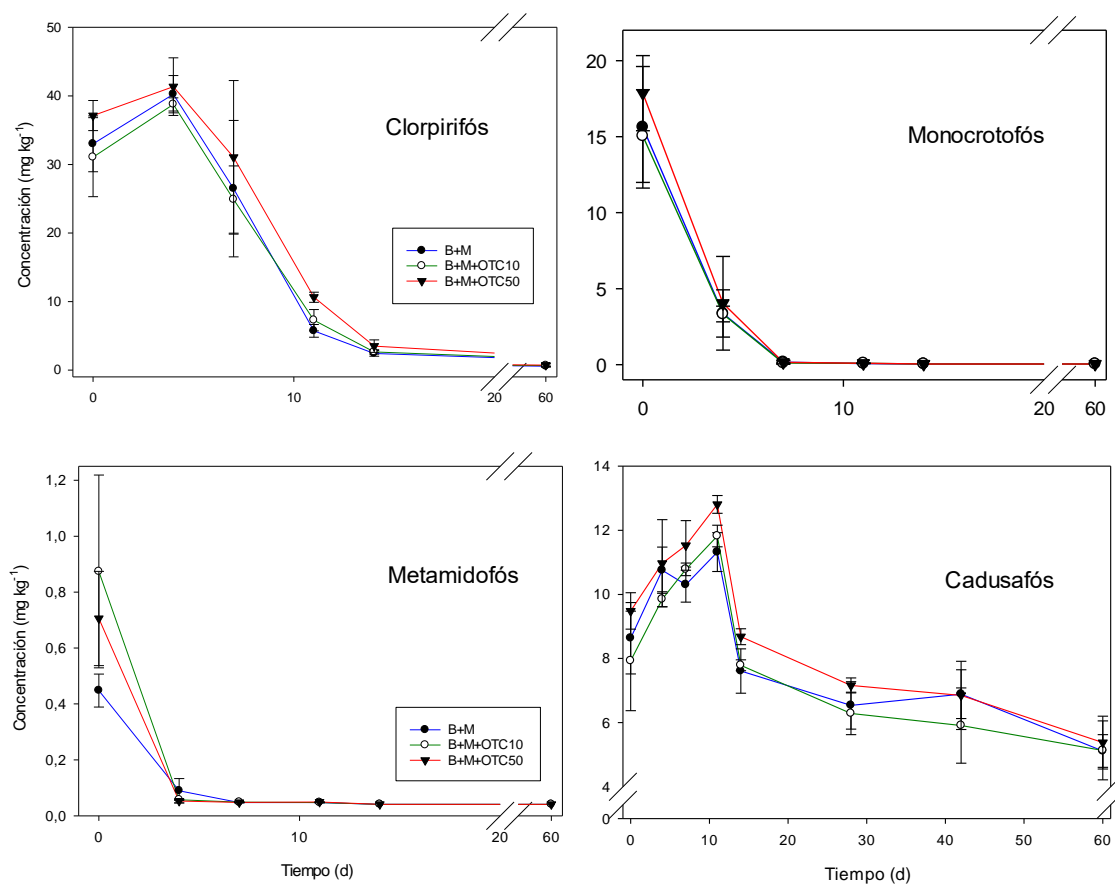


Figura 6. Eliminación de organofosforados en la biomezcla a diferentes concentraciones de oxitetraciclina. B+M: Biomezcla + mezcla de plaguicidas (●). B+M+OTC10: Biomezcla + mezcla de plaguicidas + OTC a 10 mg kg⁻¹ (○). B+M+OTC50: Biomezcla + mezcla de plaguicidas + OTC a 50 mg kg⁻¹ (▼).

Por su parte, de forma similar a los organofosforados, las cuatro triazinas mostraron una disminución en su concentración hasta valores cercanos o inferiores a los 5 mg kg⁻¹ (>95 % eliminación) al día 11, sin embargo, todas ellas durante los primeros siete días del ensayo presentaron un retraso o aparente “fase lag” en la cinética de eliminación (Figura 6), este efecto fue mucho más evidente para las triazinas que para los organofosforados CLP y CDF. Adicionalmente, se calcularon las vidas medias de eliminación (DT₅₀) según el modelo de mejor ajuste para cada una de las curvas (Cuadro 4); la TBZ y la TBT presentaron las DT₅₀ más prolongadas con valores promedio de 10.9 d y 10.3 d

respectivamente; mientras que la AMT tuvo en promedio una DT_{50} de 7.7 d, la más corta de la triazinas.

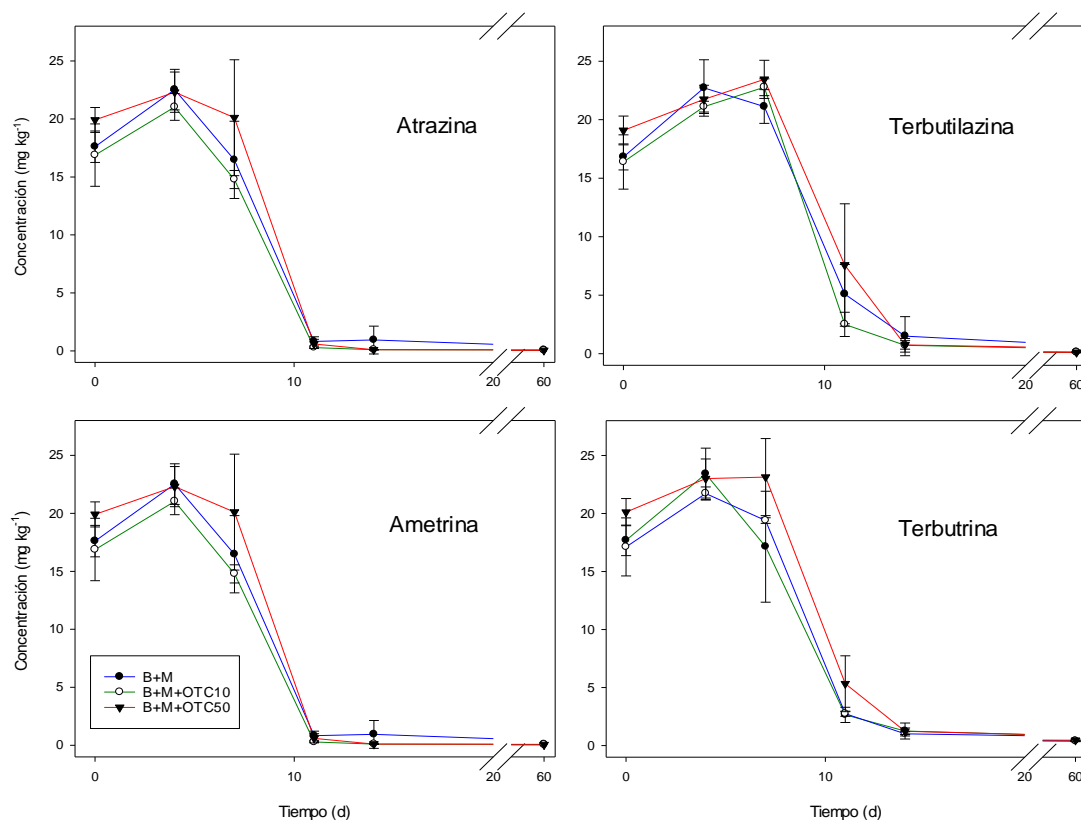


Figura 7. Eliminación de triazinas en la biomezcla a diferentes concentraciones de oxitetraciclina. B+M: Biomezcla + mezcla de plaguicidas (●). B+M+OTC10: Biomezcla + mezcla de plaguicidas + OTC a 10 mg kg^{-1} (○). B+M+OTC50: Biomezcla + mezcla de plaguicidas + OTC a 50 mg kg^{-1} (▼).

La presencia de OTC en la biomezcla no afectó el resultado final de eliminación de los plaguicidas evaluados, sin embargo, sí aportó diferencias en los DT_{50} obtenidos (figuras 6 y 7, cuadro 4). De forma simultánea a la eliminación de plaguicidas, se evaluó la eliminación de oxitetraciclina en la biomezcla (figura 8) y se encontró que al día 60 la concentración de OTC se eliminó de la biomezcla hasta en un 70.5% con una DT_{50} de 8.0 d (concentración inicial 10 mg kg^{-1}) y un 61.0% con una DT_{50} de 12.3 d (concentración inicial 50 mg kg^{-1}).

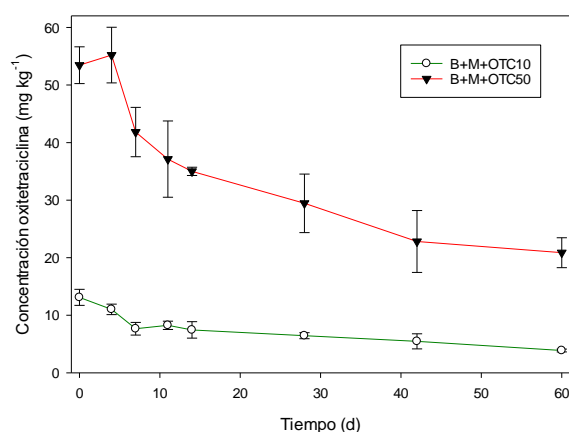


Figura 8. Perfil de concentración de oxitetraciclina durante la eliminación de triazinas y organofosforados en una biomezcla. Biomezcla con concentración inicial de oxitetraciclina de 10 mg kg⁻¹(○) y 50 mg kg⁻¹(▼).

Cuadro 4. Resumen de vidas medias y porcentajes de eliminación a los 60 días para cada uno de los agroquímicos estudiados

Agroquímico	Tratamiento ¹	Concentración inicial (µg kg ⁻¹)	Concentración final (µg kg ⁻¹)	Porcentaje de eliminación a los 60 d (%)	DT ₅₀ ² (d)	Intervalo de confianza al 50%		Modelo de mejor ajuste	Valor de r
						Superior (d)	Inferior (d)		
Atrazina	B+M	17 608.5	78.0	99.6	8.9	6.91	8.76	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC10	16 879.7	39.0	99.8	7.1	7.10	7.97	Gompertz ³	0.99
	B+M+ OTC50	19 914.4	39.0	99.8	9.5	9.55	10.92*	Gompertz ³	0.99
Ametrina	B+M	18 566.0	254.0	98.6	6.9	6.96	6.97	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC10	17 939.4	265.5	98.5	6.9	6.98	6.99	Gompertz ³	0.99
	B+M+ OTC50	21 598.3	312.4	98.6	9.4	6.99	8.27*	Gompertz ³	0.99
Terbutilazina	B+M	16 815.2	132.8	99.2	10.9	10.61	10.96	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC10	16 385.5	112.5	99.3	10.8	10.93	10.95	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC50	19 082.6	115.7	99.4	11.0	10.98	10.99*	Gompertz ³	0.99
Terbutrina	B+M	17 693.2	396.9	97.8	9.4	9.15	10.44	Gompertz ³	0.98

	B+M+ OTC10	17 123.5	383.0	97.8	10.5	10.63	10.91	Gompertz ³	0.99
	B+M+ OTC50	20 122.7	450.5	97.8	10.9	10.53	10.95	Gompertz ³	0.99
Clorpirifós	B+M	33 011.7	560.4	98.3	9.0	9.31	10.42	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC10	31 066.3	678.1	97.8	9.2	8.98	9.82	Gompertz ³	0.98
	B+M+ OTC50	37 136.6	731.4	98.0	9.6	8.04	8.75*	Gompertz ³	0.99
Metamidofós	B+M	447.6	41.0	90.8	2.0	1.83	2.47	Decaimiento exponencial ⁴	0.97
	B+M+ OTC10	874.0	41.0	95.3	1.1	1.00	1.47	Decaimiento exponencial ⁴	0.99
	B+M+ OTC50	705.7	41.0	94.2	1.2	1.13	1.16	Decaimiento exponencial ⁴	0.98
Monocrotofós	B+M	15 618.6	48.0	99.7	1.7	1.52	2.00	Decaimiento exponencial ⁴	0.99
	B+M+ OTC10	15 044.0	48.0	99.7	1.7	1.47	1.83	Decaimiento exponencial ⁴	0.99
	B+M+ OTC50	17 865.1	48.0	99.7	1.7	1.24	1.79	Decaimiento exponencial ⁴	0.99
Cadusafós	B+M	8632.5	5114.4	40.8	61.3	57.50	68.75	Decaimiento exponencial ⁴	0.81
	B+M+ OTC10	7926.2	5131.7	35.3	59.2	58.49	68.75	Decaimiento exponencial ⁴	0.76
	B+M+ OTC50	9485.1	5375.0	43.3	56.8	51.93	65.91	Decaimiento exponencial ⁴	0.82
Oxitetraciclina	10 mg kg ⁻¹	13.1	3.9	70.5	8.0	7.10	8.84	Decaimiento exponencial ⁵	0.97
	50 mg kg ⁻¹	53.5	20.9	61.0	12.3	9.89	11.42*	Decaimiento exponencial ⁵	0.95

¹ B=Biomezcla, M=mezcla de plaguicidas, OTC10=oxitetraciclina 10 mg kg⁻¹,

OTC50=oxitetraciclina 50 mg kg⁻¹

²DT₅₀: Vida media de eliminación

³ Ajuste sigmoidal de Gompertz con 3 parámetros

⁴ Decaimiento exponencial con dos parámetros

⁵ Decaimiento exponencial con tres parámetros

Se resaltan en negrita los intervalos de confianza significativamente diferentes respecto al tratamiento sin OTC

* Intervalos de confianza significativamente diferentes entre los tratamientos B+M+OTC10 y B+M+OTC50

7.2. Toxicidad residual de la biomezcla durante el tratamiento de organofosforados y triazinas en co-aplicación con oxitetraciclina

La toxicidad residual de la biomezcla se evaluó con dos diferentes organismos indicadores; los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. La toxicidad para *D. magna* disminuyó drásticamente al día 11, alcanzando detoxificaciones superiores al 94% (cuadro 5), de forma concordante con la eliminación de los plaguicidas. El caso de *L. sativa* fue diferente, en todos los tratamientos excepto B+M+OTC50, hubo un pico en el índice de germinación (IG) al día 11, lo que indica una detoxificación inicial. Sin embargo, rápidamente volvió a valores similares a los observados al inicio del ensayo. Posterior a esta caída en el índice de germinación, la toxicidad para *L. sativa* fue disminuyendo hasta alcanzar valores de IG alrededor de 60 al final del ensayo. Los cambios netos en el índice de germinación (cuadro 5) fueron de +26.0% (B+M), +22.4% (B+M+OTC10) y +36.7% (B+M+OTC50). El tratamiento con mayor concentración de OTC, tuvo un comportamiento de detoxificación con tendencia lineal durante todo el experimento para *L. sativa*. Al final del ensayo los valores del índice de germinación fueron similares para los tres tratamientos, rondando el valor de IG=60.

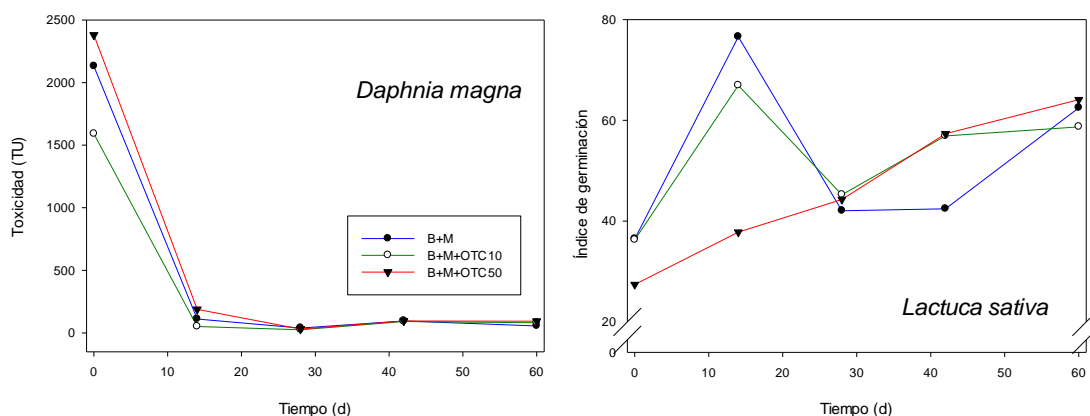


Figura 9. Cambios en la toxicidad residual en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de triazinas y organofosforados

Cuadro 5. Cambios netos de disminución de toxicidad en la biomezcla durante la eliminación de triazinas, organofosforados y oxitetraciclina.

Ensayo	<i>D. magna</i>			<i>L. sativa</i>		
	Toxicidad inicial (TU)	Toxicidad final (TU)	Cambio neto (%)	Toxicidad inicial (IG)	Toxicidad final (IG)	Cambio neto (%)
B+M	2130	56	-97.4	36.4	62.5	+26.0
B+M+OTC10	1590	81	-94.9	36.3	58.7	+22.4
B+M+OTC50	2380	94	-96.1	27.4	64.1	+36.7

7.3. Cuantificación de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas durante su eliminación en la biomezcla

7.3.1. Selección de los imprimadores y genes a evaluar en el qPCR

Inicialmente se contaba con 8 pares de imprimadores, correspondientes a dos pares de imprimadores diferentes para cada uno de 2 de los genes involucrados en las vías de degradación de las familias de plaguicidas estudiadas: triazinas y organofosforados, sin embargo, posterior a pruebas con todos los imprimadores, el total a utilizar en este estudio se redujo a los imprimadores que se muestran en el cuadro 3.

En un inicio la mayoría de los imprimadores no generaban buenas amplificaciones, a pesar que se probaron diferentes estrategias para optimizar la reacción de PCR, como el PCR touchdown, PCR en gradiente y PCR probando 3 temperaturas de annealing diferentes, por lo que se realizaron diluciones del ADN, obteniendo amplificaciones en la reacción de PCR con una dilución 1.0×10^{-1} , mientras que en la muestra sin diluir no hubo amplificación. Esto indica que en las muestras de ADN hay presencia de inhibidores como se observa en la figura 10. Se procedió a seleccionar una pareja de imprimadores por familia de plaguicidas, para ser evaluados en el qPCR. Para esto se probaron las parejas de imprimadores disponibles en un PCR punto final utilizando ADN obtenido de la biomezcla adicionada con los plaguicidas estudiados. Los imprimadores que demostraron amplificar y ser viables para el estudio fueron *atzA* EAV1 y *opd* EAV2, además de

imprimadores 16S Wang, 16S Monard y 23S, que se seleccionaron como genes *housekeeping* para las corridas de qPCR.

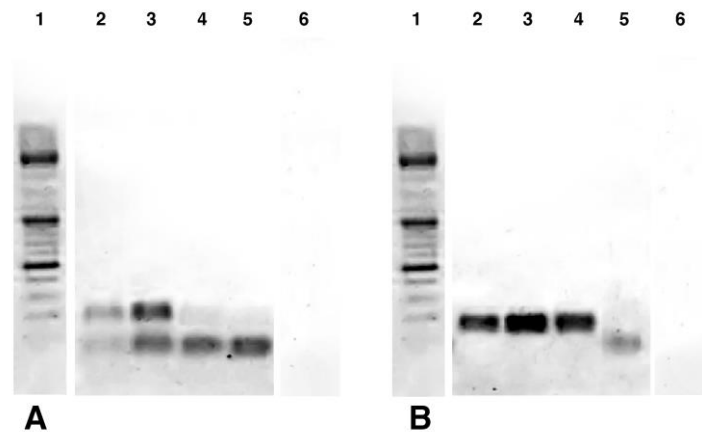


Figura 10. Gel de agarosa con los productos de amplificación de las diluciones de ADN con los imprimadores 16S Monard (A) y 16S Wang (B) para ver inhibidores. 1: MPM 50 pb; 2: Dilución 1/1; 3: 1/10; 4: 1/100; 5: 1/1000; 6: control negativo.

7.3.2. Obtención de controles positivos para qPCR

Una vez seleccionados los imprimadores y la dilución a la cual trabajar, se procedió a obtener el ADN que sería utilizado como control positivo para la corrida del qPCR. En la figura 11 se muestran las bandas que se cortaron y purificaron para usarse como controles positivos, para los carriles 3 y 6 se utilizaron las bandas con mayor intensidad las cuales corresponden a los tamaños esperados para el amplicón.

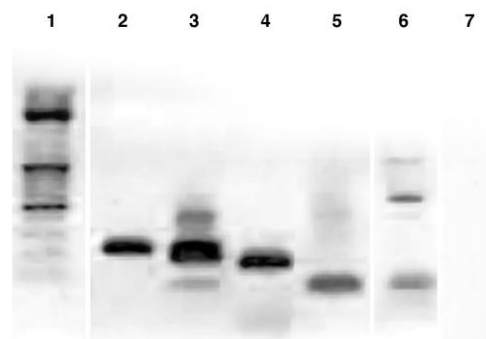


Figura 11. Gel de electroforesis con las bandas seleccionadas para purificar y usar el ADN como control positivo. 1: MPM 100 pb, 2: 23S, 3: 16S Monard, 4: 16S Wang, 5: *atzA*, 6: *opd*, 7: control negativo.

7.3.3. PCR punto final para los genes 16S Wang, 16S Monard, *atzA*, *atzD*, *opd* y *opdA* y su presencia en el tiempo

Se corrió una reacción de PCR punto final con muestras de ADN obtenido de los tratamientos B+M, B+M+OTC10 y B+M+OTC50 en diferentes puntos en el tiempo. Los resultados se muestran en la figura 11 y cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados del PCR punto final de los tratamientos B+M, B+M+OTC10 y B+M+OTC50 en el tiempo

Amplificación de genes							
Día	Tratamiento	16S Wang	16S Monard	<i>atzA</i>	<i>atzD</i>	<i>opd</i>	<i>opdA</i>
0	B+M	No	No	No	No	No	No
	B+M+OTC10	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
	B+M+OTC50	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
11	B+M+OTC10	Sí	No	No	No	No	No
	B+M+OTC50	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
28	B+M+OTC10	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No
	B+M+OTC50	Sí	No	Sí	No	No	No

Los resultados, a pesar que requieren ser afinados para obtener datos más concluyentes, pueden ser considerados como resultados preliminares que indicaron la no amplificación en estas condiciones de los genes *atzD* y *opdA* en ninguna de las muestras, pero por otro lado respecto a los otros genes, al día 0 en el tratamiento B+M+OTC10 hay una fuerte presencia de los genes 16S Wang, 16S Monard, *atzA* y *opd*, mientras que en el tratamiento B+M+OTC50 se observan las bandas de 16S Wang, 16S Monard, *atzA* y *opd*, pero mucho más débiles que en el tratamiento con la concentración de OTC más baja. Al día 11 en el tratamiento B+M+OTC10 no hubo amplificación de ningún gen además del 16S Wang, pero en B+M+OTC50 se mantuvieron los genes observados al día 0. Por el contrario, al día 28 el tratamiento B+M+OTC10 presentó los dos genes de 16S, el *atzA* y el *opd*, mientras que en B+M+OTC50 solo se observaron las bandas correspondientes a 16S Wang y *atzA*. Por lo tanto, se evidencia la presencia de los genes 16S, *atzA* y *opd* en la

biomezcla, los cuales probablemente están involucrados en la degradación de los plaguicidas, sin embargo, su distribución y expresión no son claros.

7.3.4. qPCR para los genes *atzA* y *opd* en el tiempo

La calidad y cantidad del ADN obtenido puede observarse en los cuadros A1 y A2, donde se observa que la calidad no fue la óptima. Los índices de expresión se calcularon tanto con 16S Wang como con 16S Monard como genes *housekeeping*; con el 23S no fue posible calcularlo debido a que no hubo amplificación en la curva de este gen. Además, no se presentan resultados del gen *opd* ya que ninguna de las muestras amplificó. Respecto al gen *atzA*, como se puede ver en el cuadro 9, la cuantificación siempre fue ligeramente mayor en el tratamiento B+M+OTC50; adicionalmente, el comportamiento en el tiempo mostró que la concentración del gen *atzA* disminuyó al día 28, mientras que en el día 0 y 11 fue muy similar.

Cuadro 7. Índices de cuantificación de los genes *atzA* y *opd* en la biomezcla sometida a diferentes tratamientos y su variación en el tiempo

16S Wang				
Tratamiento	Día	Promedio CT 16S	Promedio CT <i>atzA</i>	Δ CT
B+M	0	ND ¹	ND	ND
	11	33.694	ND	ND
	28	ND	ND	ND
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta$ CT	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta$ CT)
			ND	ND
B+M+OTC10	0	24.331	35.000	11.026
	11	ND	ND	ND
	28	23.196	36.181	11.500
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta$ CT	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta$ CT)
			0.474	0.720
B+M+OTC50	0	23.617	ND	ND

	11	27.540	38.032	38.032
	28	26.166	37.803	37.803
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta CT$	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
			-0.229	1.172
16S Monard				
Tratamiento	Día	Promedio CT	Promedio CT	ΔCT
		16S	<i>atzA</i>	
B+M	0	ND	ND	ND
	11	ND	ND	ND
	28	ND	ND	ND
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta CT$	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
			ND	ND
B+M+OTC10	0	18.166	35.000	16.927
	11	ND	ND	ND
	28	20.189	36.181	15.024
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta CT$	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
			-1.904	3.741
B+M+OTC50	0	17.980	ND	ND
	11	25.506	38.032	12.526
	28	22.126	37.803	16.646
Determinación de cambio en el incremento de cuantificación			$\Delta\Delta CT$	Índice de cuantificación ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
			4.120	0.058

¹ND: sin datos

7.4. Cuantificación de los microorganismos viables en la biomezcla con capacidad de degradar atrazina o clorpirifós

Los valores de NMP g⁻¹ que se presentan, en algunos de los casos, deben considerarse como un primer reporte para SBP, pero, sin embargo, deben ser verificados con ensayos

aún más extensivos, ya que no siempre fue posible seleccionar una triada de datos adecuada para el cálculo del NMP, esto a pesar que el ensayo se repitió en más de una ocasión. En los casos descritos, se seleccionó la triada que incluyera las diluciones mayores positivas.

7.4.1. NMP de degradadores de clorpirifós por mineralización de ^{14}C -CLP

El comportamiento de la población de degradadores de CLP en la biomezcla (Figura 12), fue diferente al de los degradadores de ATZ, en este caso, las mayores cuantificaciones de degradadores, se obtuvieron en el día 0 y se mantuvieron hasta el día 11 en los tratamientos B+M y B+M+OTC10, para caer a su valor más bajo en el día 28. En el caso del tratamiento B+M+OTC50 el NMP de degradadores fue disminuyendo con el paso de los días. Al día 28 la población cuantificada fue similar en todos los tratamientos, entre 1.0×10^5 y 1.0×10^6 NMP g^{-1} . Además, la población neta cuantificable fue menor en aproximadamente un logaritmo, a la población neta cuantificable de los degradadores de ATZ; a pesar de esto, la población estudiada estuvo en valores superiores a 1×10^7 NMP g^{-1} de suelo, incluso cuando las concentraciones del antibiótico OTC fueron las más altas. En este caso, también pareciera haber un efecto negativo en la población cuantificable de degradadores por la presencia de OTC, ya que a mayor concentración de OTC, mayor disminución desde el día 0 fue observada en la población de microorganismos estudiada, con diferencias mayores a un logaritmo en el NMP g^{-1} entre los tratamientos. De forma similar a lo sucedido con el ensayo de NMP para degradadores de ATZ, en el procedimiento del NMP de degradadores de CLP también debe incubarse la muestra (en este caso por 28 días) antes de poder hacer la lectura de los resultados, lo que podría permitir que haya crecimiento microbiano a pesar que el medio no lo favorece.

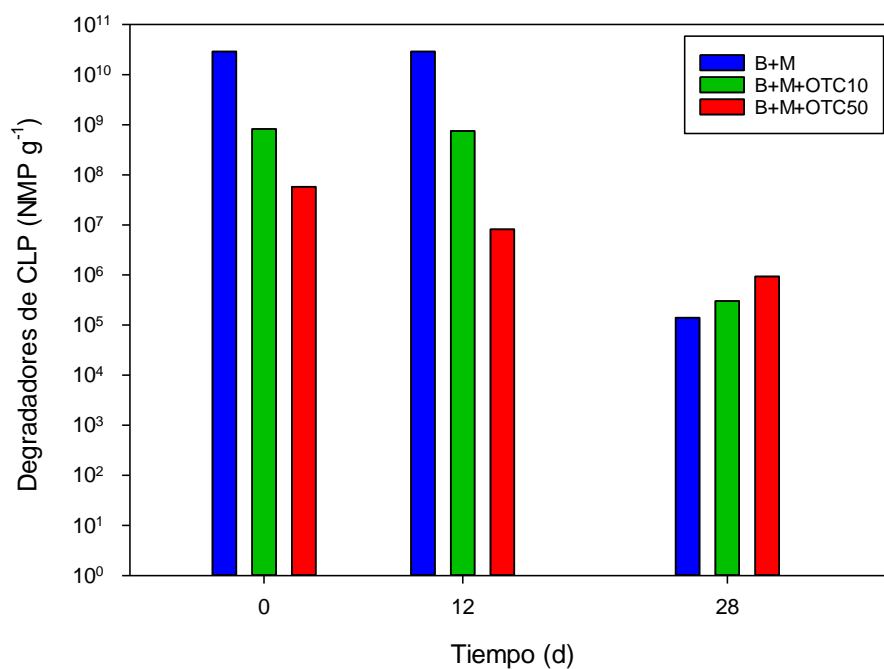


Figura 12. Cambios en el NMP de los degradadores de CLP en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de plaguicidas triazinas y organofosforados

7.4.2. NMP de degradadores de atrazina (NMP-ATZ)

En la figura 13 se muestran los valores de NMP g⁻¹ de la población de microorganismos degradadores de atrazina en la biomezcla utilizada para la eliminación de triazinas y organofosforados. Se puede observar una tendencia concordante con los datos de eliminación de la ATZ y las triazinas en general, ya que al día 11 es cuando se cuantificó una mayor población de microorganismos degradadores de atrazina. La presencia de OTC en general, sugiere ejercer un efecto negativo sobre las poblaciones microbianas degradadoras de atrazina, ya que tanto al inicio como al final del ensayo la muestra sin OTC presentó valores mayores de la población degradadora. La diferencia es más evidente al día 0, cuando hay una distancia de aproximadamente 5 logaritmos entre la muestra sin OTC y las otras dos con concentraciones de OTC de 10 y 50 mg kg⁻¹. Cabe recordar que el ensayo debe incubarse por un plazo de una semana antes de obtener los resultados y en este periodo podría haber crecimiento microbiano, a pesar que el medio que se utiliza no es un medio de crecimiento. Sin embargo, entre las biomezclas con concentraciones de 10

mg kg⁻¹ y 50 mg kg⁻¹ de OTC, no se encontró mayor diferencia en el tamaño de la población degradadora de ATZ.

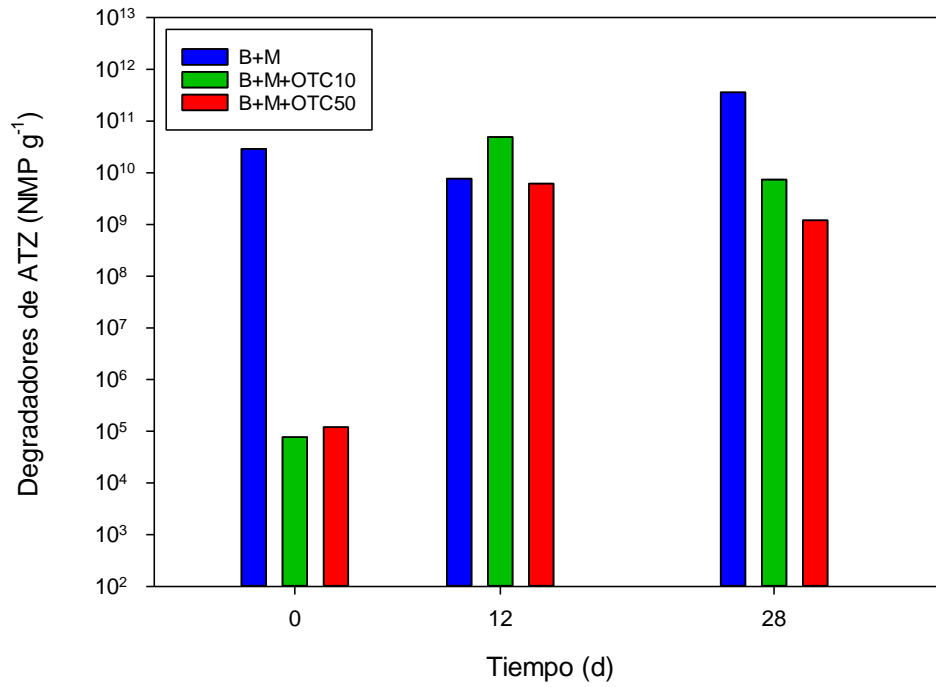


Figura 13. Cambios en el NMP de los degradadores de ATZ en la biomezcla durante la eliminación de una mezcla de plaguicidas triazinas y organosfosforados

8. Discusión

8.1. Eliminación de plaguicidas organofosforados y triazinas en presencia de oxitetraciclina

El comportamiento de los plaguicidas organofosforados y triazinas en la biomezcla demostró que esta es efectiva para tratar estos compuestos, ya que, en todos los casos, con excepción del CDF, los valores de DT_{50} obtenidos fueron de la mitad o menos del valor que se reporta en la literatura (ver cuadros 1 y 4). Respecto a lo que se ha reportado previamente para SBP (cuadro 10), la biomezcla utilizada en esta investigación, también resultó ser más efectiva para eliminar los plaguicidas estudiados, logrando las DT_{50} más bajas en comparación con las reportadas hasta el momento. Este comportamiento podría explicarse por factores, como la presencia de varios plaguicidas de las mismas familias y, por lo tanto, con similitud en sus estructuras químicas. Aunque en SBPs la degradación de mezclas de plaguicidas de una misma familia ya se ha estudiado antes (Masís-Mora et al., 2019), en este caso, la fuerza de selección sobre las poblaciones microbianas capaces de degradar estos compuestos pareciera ser de gran relevancia y puede estar ejerciendo un efecto negativo sobre los microorganismos que no cuentan con esta capacidad (Cycoñ et al., 2013; Soulas y Lagacherie, 2001). Esto además, podría explicar la fase lag observada en la eliminación de varios de los plaguicidas al inicio del ensayo, ya que si esta fuerza de selección es tan importante, es posible que se evidencie en la curva de eliminación.

La eliminación efectiva de estos plaguicidas, ya sea por procesos bióticos o abióticos, ambos presentes en los SBP, es de gran importancia, ya que como se ha mencionado antes, las familias de triazinas y organofosforados han sido detectados en suelos, fuentes de agua superficiales y sedimentos en diferentes países de Latinoamérica y el mundo, incluyendo Costa Rica (Carazo-Rojas et al., 2018; Barchanska et al., 2017; Vammen et al., 2019; Pirsahab et al., 2017). A pesar de esto, se ha visto que en los SBP, el responsable mayoritario de la degradación son los procesos bióticos mediados por las comunidades microbianas (Delgado-Moreno et al., 2019). De tal modo, estrategias como los SBP representan una solución para reducir el riesgo que su presencia representa para los ecosistemas y consecuentemente para la salud humana (Carazo-Rojas et al., 2018;

Fernandez y Gardinali, 2016; Ccancapa et al., 2016), tal como ha quedado demostrado en esta investigación; además, el favorecimiento de la degradación biótica es un aspecto deseable en la mineralización de los contaminantes, la cuál ha sido demostrada previamente en más de un 20 % en un plazo de 70 días en un SBP para el tratamiento de CLP (Castillo-González et al., 2017; Huete-Soto et al., 2017a).

Cuadro 8. Comparación de las DT₅₀ reportados previamente en SBP para los plaguicidas estudiados y OTC

Agroquímico	DT₅₀ obtenida en este estudio (d)¹	DT₅₀ reportada en previamente (d)	Referencias
Atrazina	7.1	7.8	Masís-Mora et al., 2019
		9.9	Castro-Gutiérrez et al., 2018
		<10.0	Tortella et al., 2013a, 2013c
Ametrina	6.9	231.0 / 40.3	Masís-Mora et al., 2019;
		43.9	Huete-Soto et al., 2017a
Terbutilazina	10.8	11.0	Masís-Mora et al., 2019;
		8.1	Gikas et al., 2018;
		60	Spliid et al., 2006
Terbutrina	9.4	315.0 / 187.3	Masís-Mora et al., 2019;
		34.0-51.0	Cambronero-Heinrichs et al., 2018
Clorpirifós	9.0	56.0	Masís-Mora et al., 2019
		49.1	Fogg et al., 2003b
		58.9	Urrutia et al., 2013
Metamidofós	1.1	34.0	Masís-Mora et al., 2019
Monocrotofós	1.7	110.0	Masís-Mora et al., 2019
Cadusafós	56.8	178.0	Masís-Mora et al., 2019
Oxitetraciclina	8.0	38.0	Cambronero-Heinrichs et al., 2018
		34.0	Jiménez-Gamboa et al., 2018

¹Se presenta el menor valor de DT₅₀ obtenido

En el caso de los organofosforados es importante resaltar que, acerca de la eliminación en SBP del MCF, el MTM y el CDF, existe muy poca información. Recientemente Masís-Mora et al. (2019) reportaron su eliminación en biomezclas a pequeña escala utilizadas para el tratamiento de mezclas complejas de plaguicidas, sin embargo, los DT_{50} reportados fueron de 110.0 d, 34.0 d y 178.0 d respectivamente. Mientras tanto en el actual estudio el MTM y el MCF tuvieron DT_{50} de menos de 2.0 d, mientras que incluso el plaguicida con los resultados menos prometedores de este estudio, el CDF, tuvo una DT_{50} menor (56.8 d). Esto refleja los cambios que puede haber en la eliminación de los contaminantes de un SBP a otro dependiendo incluso de los contaminantes que van a ser tratados, ya sea por interacciones químicas entre los compuestos presentes o por afectaciones a las comunidades microbianas.

Para los organofosforados CLP, MTM y MCF se alcanzaron valores promedio de DT_{50} alrededor de 9.2 d, 1.4 d y 1.7 d respectivamente, mucho menores a los que se reportan para estos plaguicidas en suelo (21 d, 4 d y 30 d respectivamente) (Lewis et al., 2016), y menores a los reportados previamente en biomezclas o SBP (cuadro 10). El cambio más significativo en la DT_{50} obtenida, respecto a lo reportado previamente se observó para el MCF, que se elimina en la biomezcla un 94.0 % más rápido que en condiciones normales en campo y un 98.5 % más rápido que en una biomezcla probada a pequeña escala para la eliminación de mezclas complejas de plaguicidas (Masís-Mora et al., 2019). Este es un plaguicida autorizado en Costa Rica para el control de insectos y ácaros en cultivos de alto consumo en el país y que forman parte de la canasta básica, como lo son la caña de azúcar, la papa, el café y el maíz, entre otros (SFE, 2017).

El CLP es un insecticida de amplio uso en el país, está autorizado para más de 10 cultivos, muchos de ellos, al igual que en caso del MCF, son productos de la canasta básica (SFE, 2017). Además, al tratarse de un plaguicida que se ha detectado en altas concentraciones en el ambiente (Carazo-Rojas et al., 2018; Echeverría-Saenz et al., 2012; Etchegoyen et al., 2017; Ccancapa et al., 2016), los sistemas de biopurificación han demostrado ser eficientes para su tratamiento y reducción del riesgo que ejerce para el ambiente (Castillo-González et al., 2017; Rivero et al., 2016; Coppola et al., 2007). Lizano-Fallas et al. (2017) reportaron en un SBP hasta el 93% de eliminación de CLP después de 20 días, mientras

que Masís-Mora et al. (2019) reportaron una DT_{50} de 56.0 d en una biomezcla a pequeña escala. Se debe rescatar, además, que la curva de eliminación del CLP en la biomezcla tuvo un comportamiento sigmoideal (Figura 7), con una fase lag los primeros 4 días del ensayo, menor a la observada en las triazinas. Anteriormente se ha descrito la presencia de una fase lag inicial en la eliminación de algunos plaguicidas organofosforados en suelo (Cycoń et al., 2013), sin embargo, es más común ver curvas que se ajusten a un decaimiento exponencial (Castillo-González et al., 2017; Fogg et al., 2003b), como fue el caso de los otros plaguicidas organofosforados estudiados en esta investigación (cuadro 4). A pesar de las diferencias en la curva de mejor ajuste, la vida media de todos los contaminantes estudiados se pudo calcular como cinéticas de primer orden, lo cual indica que son independientes de la concentración inicial del plaguicida y son las más comunes en los procesos de degradación de plaguicidas, sin embargo, no siempre se ajustan adecuadamente (Cycoń et al., 2013; Fogg et al., 2003b).

El cadusafós mostró un comportamiento diferente a los demás plaguicidas organofosforados y triazinas. Fue el único plaguicida que no alcanzó porcentajes de eliminación mayores al 90 %, de hecho, no superó el 43 % (cuadro 4) y las DT_{50} calculadas para describir su comportamiento en la biomezcla (61.3 d para B+M; 59.2 d para B+M+OTC10 y 56.8 d para B+M+OTC50), arrojaron valores superiores al reportado para este plaguicida en suelo (49 d) (Lewis et al., 2016), sin embargo, estos valores fueron menores a los reportados previamente en biosistemas de pequeña escala utilizados para el tratamiento de mezclas complejas de plaguicidas (178.0 d) (Masís-Mora et al., 2019). Esto puede deberse a que las vías de degradación del cadusafós contengan enzimas diferentes involucradas a las que participan en las rutas de degradación de los otros organofosforados presentes, y que no estén presentes en proporciones equivalentes, sin embargo, se requiere de más experimentos para probar esta hipótesis. Este planteamiento concuerda con los hallazgos de Ahn et al. (2018), quienes trabajaron con dos cepas de *Sphingobium* sp. capaces de degradar eficientemente cadusafós, etoprofós, fentoato y forato, sin embargo, no fueron capaces de degradar clorpirifós y diazinon. Es importante resaltar que el cadusafós fue el plaguicida con el modelo de ajuste para el cálculo de la DT_{50} , que presentó los valores más bajos de correlación (r), 0.81; 0.76 y 0.83 respectivamente para cada uno de los tratamientos.

Las triazinas, son de los herbicidas más ampliamente utilizados para el control de malezas por su alta efectividad en el control de las mismas, incluso en algunos países se utilizan con fines no agrícolas, por ejemplo, en el mantenimiento de carreteras y en la esterilización de suelos (Papadopoulos et al., 2012; Malá y Gebauer, 2017). En el caso de las triazinas estudiadas, para todas se observó una reducción importante en la DT_{50} respecto a los valores reportados previamente en suelo e incluso respecto a los que se han reportado para biomezclas de SBP. En esta investigación las DT_{50} alcanzaron valores promedio de 8.5 d; 7.7 d; 10.9 d y 10.3 d para ATZ, AMT, TBZ y TBT respectivamente, mientras que los valores de DT_{50} en suelo para estos herbicidas corresponden a 29 d, 37 d, 22 d y 52 d; y en SBP se han reportado valores de 7.8 d, 40.3 d, 8.1 d y 34.0 d respectivamente (ver cuadro 10). Esto representa reducciones en la DT_{50} de hasta un 80 % en el caso de TBT. La TBT se utiliza en Costa Rica principalmente en el cultivo de caña de azúcar, e incluso ha sido detectada en fuentes de agua superficial y sedimento aledañas a este cultivo en la zona de Guanacaste, representando un riesgo mucho más elevado a los aceptados para los ecosistemas de la zona (Carazo-Rojas et al., 2018). Por lo tanto, la implementación de un sistema sencillo, como los SBP planteados en este trabajo, reducirían significativamente el riesgo asociado al uso de este plaguicida sin necesidad de prohibiciones que afecten la productividad.

Otro aspecto a resaltar de la eliminación de las triazinas en la biomezcla, es que las cuatro que se probaron presentaron una fase lag o retraso en su eliminación, similar a la observada para CLP, solo que en el caso de las triazinas, la fase lag se mantuvo hasta cerca de una semana, antes de ver una caída importante en la concentración de los plaguicidas (figura 9), como se mencionó antes este comportamiento se ha descrito para algunos plaguicidas en suelo (Cycoń et al., 2013), sin embargo, en las biomezclas de los SBP no se había descrito hasta el momento; Knight et al. (2016) han descrito una fase lag en la producción de CO_2 en el biobed después de la aplicación del herbicida 2,4-D, y autores como Sniegowski et al. (2012), han reportado la fase lag en la mineralización de herbicidas, sin embargo, la eliminación no se reportó en estos casos y como se sabe, la mineralización requiere más pasos a nivel de reacciones que la eliminación, por lo que las fases lag son comunes.

La ATZ por su parte es el plaguicida mejor estudiado y más utilizado de la familia de las triazinas (Malá y Gebauer, 2017), y se sabe que además, las principales vías de degradación de esta familia han sido descritas con la ATZ, además se ha encontrado que los organismos capaces de degradar ATZ con frecuencia logran degradar otras triazinas por reacciones cruzadas (Moran et al., 2006). En la biomezcla se alcanzaron DT_{50} para ATZ de hasta 7.1 d, de las menores que han sido obtenidas en biomezclas, por ejemplo, Huete-Soto et al. (2017a) reportaron DT_{50} de 23.7 d y Chu y Eivazi (2018) de 14.3 d, mientras que Masís-Mora et al. (2019) obtuvieron en una biomezcla utilizada a pequeña escala DT_{50} de 7.8 d y de <10 d en un SBP para tratar altas cantidades de desechos de plaguicidas, muy similares a la obtenida en el presente estudio. Por su parte, Tortella et al. (2013a) también trabajaron con una biomezcla eficiente para la eliminación de ATZ (96 % de eliminación en 30 días), pero además, encontraron que aplicaciones sucesivas de ATZ no afectaron la tasa de eliminación. La eficiencia encontrada en la degradación de este herbicida, representa un hallazgo importante que sugiere que la biomezcla es una matriz efectiva para el tratamiento de otros herbicidas de la familia de las triazinas.

La TBZ como se mencionó anteriormente, ha sido estudiada en biobeds, reportando DT_{50} desde 60.0 d hasta 8.1 d (Spliid et al., 2006; Gikas et al., 2018), mientras que el valor reportado en esta investigación fue de 10.8 d, sin embargo, es importante resaltar que los datos de la eliminación de terbutilazina presentados por Gikas et al. (2018), corresponden a un estudio paralelo que se hizo con la misma biomezcla de la presente investigación y en condiciones similares, por lo tanto tiene sentido que las DT_{50} sean muy similares y las más bajas reportadas hasta el momento para TBZ.

Por otro lado, es importante resaltar que todas las triazinas presentaron diferencias significativas en el intervalo de confianza al 50% para la DT_{50} del tratamiento B+M+OTC50 respecto a los tratamientos sin OTC y con OTC a 10 mg kg^{-1} (a excepción de TBT que solo presentó diferencia significativa con el tratamiento sin OTC), no obstante, al comparar el efecto de la OTC a 10 mg kg^{-1} , solo se encontraron diferencias significativas en el caso de la AMT y la TBT. Esto evidencia que, a pesar que en presencia de OTC la biomezcla continúa siendo efectiva, la concentración del antibiótico si tiene un efecto en el proceso de degradación de las triazinas. Cabe resaltar, además, que la AMT

fue la triazina que más se vio afectada por la presencia de OTC en la concentración más elevada, dado que la DT_{50} aumentó en un 27 % en el tratamiento B+M+OTC50, respecto al tratamiento sin OTC, y el intervalo de confianza al 50 % para la vida media fue significativamente diferente a los obtenidos en los otros dos tratamientos; no obstante, los intervalos de confianza de estos dos tratamientos son muy estrechos y con diferencias de menos de 1 día (cuadro 4). Este dato es novedoso y a la vez concordante con investigaciones previas, pues aporta conocimiento respecto a las concentraciones de OTC que afectan la eliminación de la AMT en los SBP. Anteriormente, en una biomezcla similar a la de este estudio, se siguió la eliminación de mezclas de plaguicidas, entre estos la AMT, sin embargo, se encontró que a concentraciones de 17 mg kg^{-1} de OTC la DT_{50} de AMT aumentó en casi un 40 %, al compararse con la DT_{50} de la biomezcla sin OTC (Huete-Soto et al., 2017a); lo que evidencia que el efecto se presenta solamente a concentraciones mayores a los 10 mg kg^{-1} . Además, en la misma investigación se reportaron valores de DT_{50} para la ametrina mayores a los 40 días en ausencia de OTC, mucho mayores a los obtenidos en este experimento (menores a 10 d; ver cuadro 4), lo que demuestra que pequeñas diferencias en las biomezclas y/o las mezclas de plaguicidas por tratar, pueden resultar en diferencias en los perfiles de eliminación.

A pesar de esto, el porcentaje de eliminación al final del experimento fue similar en los tres tratamientos, lo que evidencia el efecto de la presencia de la fase lag inicial en la degradación de las triazinas. Este comportamiento no había sido descrito antes en la eliminación de plaguicidas con biomezclas de Costa Rica, sin embargo, sí se ha descrito que la mineralización de contaminantes, como los plaguicidas, se ajustan a modelos sigmoidales como el de Gompertz (Johnsen et al., 2013), incluso Monard et al. (2013) reportaron que la curva de mineralización de ATZ se ajustó a un modelo de Gompertz de 3 parámetros, mismo modelo que se usó para las triazinas y el CLP en este estudio. También, Topp (2001) describió que bacterias del género *Nocardiodes* eran capaces de acelerar la eliminación de atrazina cuando están en densidades de 10^5 cél g^{-1} de suelo, pero solo después de una fase lag de varios días, a diferencia de las bacterias del género *Pseudoaminobacter*, que en las mismas condiciones lograron acelerar la eliminación de atrazina pero sin la fase lag previa. Esto sugiere que el retraso observado en la eliminación

de las triazinas puede responder a los microorganismos presentes en la biomezcla encargados de la degradación de estos compuestos.

La OTC por su parte, es una tetraciclina utilizada como agroquímico para el control de plagas bacterianas en los cultivos, por lo tanto, sigue la misma dinámica de almacenaje, aplicación y descarte que otros agroquímicos como los plaguicidas (Vidaver, 2002). Respecto a su efecto cuando es aplicado a diferentes concentraciones (10 mg kg^{-1} y 50 mg kg^{-1}) y las diferencias entre cada uno de los tratamientos, tanto en el caso de los organofosforados como en el ya discutido caso de las triazinas, pareciera que en general entre mayor es la concentración de OTC, mayor es la DT_{50} observada para los plaguicidas, sin embargo, las diferencias entre tratamientos observadas con los organofosforados solo fueron significativas en el caso del CLP y el MTM (cuadro 4), para el MNC y el CDF no hubo diferencias significativas al 50% de confianza, por lo que se concluye que **OTC no afecta la eliminación de estos dos plaguicidas a estas dosis en el SBP**. Previamente en estudios de eliminación de plaguicidas en SBP con presencia de antibióticos, se han encontrado resultados concordantes con los de este estudio. Cambroner-Heinrichs et al. (2018) demostraron que la OTC no afectó negativamente la eliminación de triazinas en un SBP, mientras que Castillo-González et al. (2017) demostraron lo mismo en un SBP para el tratamiento de fungicidas.

Adicionalmente, se ha visto que la presencia de OTC a muy altas dosis ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$), estimuló la respiración de una biomezcla de un SBP y a dosis bajas ($\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$) incrementó la mineralización de CLP recordando un efecto hormético, descrito también para la mineralización del carbofurán (Huete-Soto et al., 2017a; Jiménez-Gamboa et al., 2018). Sin embargo, con la mezcla de plaguicidas utilizada en este estudio y las condiciones del experimento no se presentó el mismo efecto, lo que podría indicar que no es una característica que se observe siempre que estén CLP y OTC juntos, sino que depende de condiciones adicionales. Los resultados obtenidos por Castillo-González et al. (2017), parecieran confirmarlo, ya que en presencia de una mezcla de OTC y gentamicina la respiración de la biomezcla y la mineralización inicial del CLP se vieron disminuidas. Para poder sacar mejores conclusiones respecto al efecto hormético, sería importante analizar la mineralización del CLP con las condiciones estudiadas en el presente trabajo.

Por último, la biomezcla utilizada demostró ser efectiva para la eliminación no solo de los plaguicidas, sino también de la OTC, no obstante, la eliminación del antibiótico es significativamente más rápida a la concentración de 10 mg kg^{-1} . Por lo tanto, los SBP son una alternativa para el tratamiento incluso de antibióticos de uso agrícola en mezclas complejas de agroquímicos, esto se había reportado antes en biomezclas para el tratamiento de carbofurán (Jiménez-Gamboa et al., 2018) y de triazinas (Cambronero-Henrichs et al., 2018). Sin embargo, la DT_{50} para la OTC obtenida en esos estudios fue de 34 d y 38 d respectivamente, en el actual estudio, se logró alcanzar DT_{50} mucho menores (8,02 d y 12,3 d). En el caso del ensayo con triazinas, los investigadores realizaron un pretratamiento de la OTC en un reactor de tanque agitado, sin embargo, se concluyó que este tipo de pretratamiento no es obligatorio por la efectividad que demostró la biomezcla por si sola (Cambronero-Henrichs et al., 2018). Por su parte, el presente estudio lo confirma, incluso demuestra que la biomezcla se mantiene efectiva para el tratamiento de los plaguicidas y de la OTC cuando se utilizan mezclas más complejas de plaguicidas.

8.2. Toxicidad residual de la biomezcla durante el tratamiento de organofosforados y triazinas en co-aplicación con oxitetraciclina

La ecotoxicidad es un parámetro que siempre debería ser evaluado en estudios de eliminación o degradación de contaminantes, ya que el objetivo final es reducir los efectos de los contaminantes en el ambiente. La detoxificación de biomezclas utilizadas en SBP para el tratamiento de plaguicidas, sobre la también conocida como pulga de agua *D. magna*, uno de los organismos globalmente más utilizados para estudios de ecotoxicidad, y *L. sativa*, ha sido evaluada previamente, encontrando resultados variables (Huete-Soto et al., 2017b).

Además, como puede observarse en la figura 9 y en el cuadro 5, la toxicidad sobre *D. magna* fue similar en todos los tratamientos y se lograron detoxificaciones de casi el 100% al final del ensayo (60 d); estos resultados demuestran que la presencia de OTC no es determinante en la toxicidad sobre *D. magna*. Los resultados de este ensayo (detoxificaciones de más del 90% en 11 días) también son concordantes con ensayos ecotoxicológicos realizados durante estudios de eliminación del CLP, ATZ, AMT y TBT en una biomezcla similar a la utilizada en esta ocasión, donde se observaron rápidas

detoxificaciones de más del 90% en 10 días para *D. magna* (Lizano-Fallas et al., 2017). Además, la disminución en la toxicidad coincide con las curvas de eliminación, ya que al día 11 del ensayo, cuando se observó el mayor pico en la eliminación de los plaguicidas, también se alcanzó la mayor detoxificación para *D. magna* de la biomezcla con los diferentes tratamientos, y se mantuvo en niveles similares hasta el final del ensayo.

El comportamiento de la toxicidad para *L. sativa* fue muy diferente. En los tratamientos B+M y B+M+OTC10, se observó una detoxificación inicial al día 11, representada con un aumento en el índice de germinación hasta 76.6 y 66.9 respectivamente (figura 9), sin embargo, al día 28 los valores del índice de germinación cayeron hasta 42.0 y 45.2, cercanos al nivel más tóxico, el del día 0. Esto indica que a pesar que en la curva de eliminación se evidencia que las moléculas agregadas al inicio del experimento se habían eliminado casi por completo para este punto (figuras 8 y 9), es probable que se hayan generado otros productos de transformación con un efecto tóxico igual o mayor al de las moléculas iniciales, producto de la degradación de las moléculas originales, por lo que también requieren ser detoxificados. Esto ha sido reportado para otras sustancias, tal como el carbofurán, un plaguicida de la familia de los carbamatos, y sus metabolitos 3-ketocarbofurán y 3-hidroxicarbofurán, los cuales poseen una alta toxicidad (Otieno et al., 2010). Al día 60, la toxicidad continuaba reduciéndose para *L. sativa*, donde los valores del índice de germinación fueron de 62.5 para B+M y 58.7 para B+M+OTC10; sin embargo, no alcanzaron los valores obtenidos en la detoxificación inicial, lo que indica que los procesos de detoxificación de estas nuevas sustancias, incluidos los procesos microbianos, son más lentos que los de las moléculas iniciales.

A diferencia de lo observado para *D. magna*, con los resultados obtenidos no es posible saber si la biomezcla es capaz de alcanzar la detoxificación completa para *L. sativa*. Para tener certeza de esto es necesario realizar ensayos similares por un periodo de tiempo mayor y que permitan conocer a qué compuestos se atribuye el efecto tóxico, considerando que estudios previos han demostrado que la OTC posee un efecto tóxico sobre *L. sativa*, incluso más importante que el producido por algunos herbicidas (Huete-Soto et al., 2017b). Además, es necesario recordar que los procesos de degradación microbiana, a los que atribuimos la mayor parte de la eliminación de contaminantes orgánicos como los

plaguicidas, frecuentemente involucran la participación de diferentes especies microbianas, ya que es poco común que una misma especie lleve a cabo todos los pasos necesarios para la degradación (Singh y Singh, 2016). También es frecuente que la degradación se lleve a cabo por medio de reacciones de cometabolismo (Ye et al., 2018), que son aquellas que permiten que una sustancia entre en las vías metabólicas de un organismo cualquiera, porque cuenta con una estructura similar al sitio blanco de alguna molécula que forma parte del metabolismo central de este organismo, o por inespecificidad de alguna enzima involucrada en la ruta de degradación (Horvath, 1972). Cabe destacar que cuando una molécula es degradada por cometabolismo, esto no implica que el microorganismo involucrado sea capaz de continuar con la degradación en los pasos posteriores a la reacción cometabólica.

Por su parte la biomezcla con el tratamiento B+M+OTC50, a diferencia de los otros dos tratamientos, no presentó un pico de detoxificación inicial tan marcado, sino que tuvo un comportamiento lineal a lo largo del tiempo, para alcanzar valores de IG similares a los alcanzados en los otros dos tratamientos. Sin embargo, como el IG fue el menor de los 3 tratamientos al inicio del ensayo, el cambio neto en la toxicidad sobre *L. sativa* fue el mayor con un valor de 36.7% (cuadro 5). La ausencia del pico de detoxificación inicial puede deberse al efecto tóxico de la OTC sobre *L. sativa*, el cual ha sido demostrado previamente por Huete-Soto et al. (2017b) en un SBP para la eliminación de herbicidas y fungicidas en co-aplicación de OTC a una concentración de 17 mg kg⁻¹. A pesar que en este estudio el tratamiento B+M+OTC10 presentó un comportamiento similar al tratamiento sin OTC, en términos de toxicidad para *L. sativa*, esto en lugar de contradecir el efecto tóxico de la OTC lo confirma y aporta información importante, ya que pareciera que el efecto tóxico en lechuga es mucho más importante a concentraciones elevadas de OTC (mayores a los 10 mg kg⁻¹), mientras que a concentraciones más bajas la toxicidad es dada mayoritariamente por otros agroquímicos desechados en la biomezcla. Otras plantas usadas frecuentemente como indicadores de toxicidad también han mostrado ser sensibles a OTC, tal es el caso de la alfalfa (*Medicago sativa*) y la lenteja de agua (*Lemna minor*) (Kong et al., 2007; Pro et al., 2003). Tampoco se descarta la posibilidad de que haya reacciones de sinergia entre la mezcla de plaguicidas y la OTC a concentraciones superiores a los 10 mg kg⁻¹, que podrían aumentar la toxicidad de los elutriados obtenidos

de la biomezcla hacia *L. sativa* cuando las concentraciones de OTC son mayores (Gomez-Eyles et al., 2009; Hernández et al., 2013).

Finalmente, con los hallazgos relacionados a la eliminación de los contaminantes y la toxicidad residual en la biomezcla obtenidos en esta investigación, se considera que un SBP como el planteado en este estudio es una buena alternativa para tratar de forma efectiva, triazinas, organofosforados e incluso la OTC, tomando en consideración únicamente la concentración del antibiótico (que sea $\leq 10 \text{ mg kg}^{-1}$) para obtener detoxificaciones más rápidas y reducir los efectos tóxicos en plantas. Además, se evidencia la importancia de evaluar la toxicidad en más de un indicador biológico, ya que los efectos pueden ser diversos y no todos los organismos indicadores poseen la misma sensibilidad a los diferentes contaminantes.

8.3. Cuantificación de genes involucrados en la degradación de organofosforados y triazinas durante su eliminación en la biomezcla

La cuantificación de genes involucrados en la degradación de plaguicidas en los SBP, ha sido un área poco explorada, a pesar de que ha habido interés por conocer los cambios en la diversidad microbiana y funcional de la biomezcla (Castro-Gutiérrez et al., 2019, Castro-Gutiérrez et al., 2018; Karas et al., 2016; Tortella et al., 2013a; Tortella et al., 2013b), además de los estudios genéticos que se han desarrollado sobre algunos microorganismos específicos aislados de SBP o utilizados para bioaumentar las biomezclas (Karas et al., 2016; de Souza et al., 1996; Zhang et al., 2013). Esto en parte se debe a la complejidad de la biomezcla y de los microorganismos presentes en ella, además de la variabilidad genética que puede existir de una biomezcla a otra (Bergsveinson et al., 2018); sin embargo, es de gran interés conocer las diferencias en la dinámica microbiana y la expresión génica de los responsables de la degradación de contaminantes, en respuesta a los estímulos químicos. El presente trabajo, establece los primeros resultados de la cuantificación de genes involucrados en las vías de degradación de plaguicidas en un SBP, a la vez que se comparan con una curva de eliminación.

El proceso de selección de los imprimadores y genes, descrito en la sección de resultados, permitió seleccionar los genes más adecuados para el estudio. En el cuadro 6 y la figura 10 se puede observar que los imprimadores de *atzD* y *opdA* producían con frecuencia

amplificaciones inespecíficas, además que no amplificaron con las muestras de biomezcla; por esta razón estos imprimadores se excluyeron de la cuantificación con qPCR. Además, los resultados de la calidad y cantidad del ADN extraído que se muestran en el cuadro A1 muestran que la eficiencia de las extracciones fue baja, así como la de la purificación de las bandas amplificadas para controles positivos. Otros autores, han reportado bajas eficiencias al extraer ADN de muestras complejas como el suelo (Sagova-Mareckova et al., 2008; İnceoğlu, et al., 2010), donde se ha observado que pH bajos y el contenido de agua pueden afectar la eficiencia de la extracción incluso utilizando kits especializados como el kit NucleoSpin™ Soil (Macherey-Nagel), utilizado en este estudio (Sagova-Mareckova et al., 2008). Además, se ha descrito que el contenido de arcillas, materia orgánica y ácidos húmicos también interfiere en la eficiencia de extracción, debido a que el ADN se adsorbe fácilmente a estas partículas y los ácidos húmicos inhiben la reacción de PCR (Sagova-Mareckova et al., 2008; Roose-Amsaleg et al., 2001; Robe et al., 2003). Cabe destacar que, por estos motivos, en este estudio se procuró hacer la extracción con ayuda de un kit que mejore la pureza del ADN extraído, sin embargo, al parecer no fue suficiente, ya que como se muestra en la figura 10, al realizar la reacción de PCR con diluciones del ADN, se evidenció la presencia de inhibidores. Es probable que el efecto inhibitorio esté dado por las altas cantidades de materia orgánica y de ácidos húmicos en la biomezcla, pues se ha reportado que son potentes inhibidores de la polimerasa (Kermekchiev et al., 2009), y la presencia de compost en la biomezcla incrementa la cantidad de estas sustancias respecto al suelo. A pesar de esto, en estudios con biomezclas no se ha reportado hasta ahora la presencia de inhibidores de la PCR. La metodología utilizada para la obtención de los controles positivos se ha recomendado anteriormente para muestras de suelo, ya que aporta una imagen más real de la matriz compleja que se está trabajando (Smith et al., 2006; de Sosa et al., 2018), sin embargo, en el presente estudio no mostró resultados favorables. Las curvas dieron bajos porcentajes de amplificación, por lo que pareciera que usar amplicones purificados de una reacción de PCR no es una buena estrategia puesto que no se amplifican adecuadamente en una segunda reacción de PCR, en este caso de qPCR. Esto se puede deber a exceso de dNTPs, o a la ausencia de las secuencias ubicadas antes de la secuencia blanco o incluso pérdida de pares de bases al inicio de la secuencia, lo que podría afectar la unión a los

imprimadores en la segunda reacción de PCR y con ello la especificidad de esta segunda amplificación. Una posibilidad para mejorar los controles positivos, sería clonar el gen de interés en un plásmido y posteriormente hacer la extracción a partir del plásmido para tener mejores rendimientos en la reacción del qPCR (Ursi et al., 1992).

Del PCR punto final efectuado a los diferentes tratamientos en el tiempo, se puede observar que para los genes *atzA* y *opd* se obtuvieron amplificaciones del mismo tamaño que las amplificaciones de los controles utilizados, por lo que se pareciera que están presentes en la biomezcla y podrían estar posiblemente involucrados en la eliminación de las triazinas y organofosforados, respectivamente, en el SBP. A pesar de esto, su presencia no fue constante en el tiempo. Esto podría deberse a diferentes factores, el más importante de ellos, considerando que anteriormente se demostró la presencia de inhibidores de la reacción de PCR, es que, a diferentes puntos en el tiempo, e incluso según cada muestra, la concentración de inhibidores cambie y que la dilución utilizada no haya sido suficiente para eliminar su efecto inhibitorio. Otros autores han reportado que provocando alteraciones mutacionales de la polimerasa el efecto de los inhibidores desaparece (Kermekchiev et al., 2009); esta es una alternativa que permitiría obtener resultados más confiables a partir de las muestras de la biomezcla. Otro factor podría ser las alteraciones en las poblaciones de microorganismos en el tiempo y en respuesta al estímulo de contaminantes; de este modo si la frecuencia del gen es muy baja en la población, la dilución del ADN y una baja eficiencia en la extracción podrían hacer que en la reacción de PCR no se detecten los genes de interés.

Por último, los resultados obtenidos del qPCR reflejan cambios mínimos en el índice de cuantificación del gen *atzA* a los días 0, 11 y 28, ya que las concentraciones, además del cambio en el incremento de la cuantificación, se mantuvieron muy bajas y en algunas muestras no fue posible su cuantificación, mientras que no fue posible cuantificar el gen *opd*. Al comparar estos valores con otros estudios que han cuantificado genes específicos en suelo, como el gen *amoA* involucrado en la oxidación del amonio, obteniendo valores de la abundancia del gen alrededor de 10^3 - 10^6 copias g^{-1} de suelo (Feld et al., 2015), los valores obtenidos en este estudio se consideran bajos y rechazan la hipótesis de que estos genes estarían presentes en gran cantidad en la biomezcla. La principal razón de esto es

posible que sea nuevamente la presencia de inhibidores en las muestras de ADN utilizadas, ya que pueden interferir en la cuantificación de los genes y dar falsos negativos (Wang et al., 2017). Por su parte, con los datos obtenidos pareciera ser que no existe un efecto de la OTC en la cuantificación del gen *atzA* en la biomezcla, ya que todos los índices relativos de expresión presentaron valores similares. Esto concuerda con los otros resultados obtenidos en este estudio, que demuestran que la OTC no genera grandes efectos en la eliminación de los plaguicidas organofosforados y triazinas, y abre una nueva pregunta relacionada a los genes de resistencia a los antibióticos presentes en la biomezcla. Por otro lado, sí pareciera haber un efecto según el tiempo transcurrido desde la aplicación de los agroquímicos, ya que al día 28 es cuando se logró cuantificar los genes con mayor frecuencia, a pesar que en ese punto en el tiempo ya se habían eliminado casi por completo las moléculas de plaguicidas añadidas al inicio del ensayo, mientras que a los días 0 y 11 no se logró cuantificar los genes en la mayoría de las muestras (ver cuadro 9), a pesar de que al día 11 se observó la mayor caída en la concentración de ATZ y las triazinas en general. Esto podría deberse a que como se ha mencionado antes, la eliminación de las moléculas padre no implica la mineralización (Abdelraheem et al., 2015), por lo que puede haber productos de transformación siendo aún degradados y favoreciendo a las poblaciones capaces de degradar triazinas. Inicialmente, se esperaba que este fenómeno fuera mínimo debido a que la enzima atrazina clorhidrolasa codificada por el gen *atzA* se ha descrito que es la primera enzima que participa en el proceso de mineralización de la ATZ en bacterias gram negativas (Wang et al., 2005), sin embargo, no se puede descartar que las bacterias capaces de degradar metabolitos de la ATZ, posean también el gen *atzA*. El estudio del ARN para evaluar la expresión del gen en el tiempo, ayudaría a dilucidar mejor el papel de la enzima *atzA* en el tiempo.

8.4. Cuantificación de los microorganismos viables en la biomezcla con capacidad de degradar atrazina o clorpirifós

Es importante resaltar, que la metodología utilizada tiene sus limitaciones y que el resultado obtenido no se puede considerar como el número absoluto de los degradadores de ATZ en la biomezcla, debido a que las condiciones del experimento, como la atmósfera de incubación, la temperatura, entre otras, conducen a subestimaciones de la población

real (Ellingsøe y Johnsen, 2002). De igual forma para el caso de CLP es importante tener en consideración que, como lo que se cuantifica es el plaguicida mineralizado, es probable que la población de degradadores sea mayor, ya que como se sabe, la mineralización es la degradación completa, hasta los productos más sencillos (CO_2 y H_2O en este caso), por lo que las reacciones de degradación parcial mediadas por microorganismos y reacciones cometabólicas, no estarían siendo consideradas (Xu, et al., 2007). Sin embargo, los datos recolectados con este tipo de ensayos son datos valiosos a pesar de sus limitaciones porque permiten hacer comparaciones entre tratamientos y obtener un valor base del número de microorganismos meta.

Adicionalmente, se debe mencionar que a pesar que los resultados obtenidos evidencian tendencias claras, estos resultados deben ser verificados y la prueba refinada, ya que las triadas utilizadas para el cálculo del NMP fueron seleccionadas por ser las que demostraban positividad en las diluciones más altas, pero en algunos casos hubo presencia de dos posibles triadas a seleccionar o de resultados irregulares en la positividad de las diluciones realizadas. Entre las posibles explicaciones a este fenómeno, se sospecha la presencia de algún tipo de inhibidor en la biomezcla que provoque resultados falsamente negativos o bajos en las muestras menos diluidas. Casos de inhibidores han sido reportados previamente en el desarrollo de cuantificaciones por el NMP. Tal es el caso de Papan y Von Berg (1998), al tratar de estimar el número de bacterias nitrificadoras en suelo, donde parecía no haber crecimiento en las muestras menos diluidas; en este caso el efecto inhibidor se le atribuyó a la atmósfera producto de la intensiva respiración de las bacterias de crecimiento rápido. La enumeración de bacterias degradadoras en matrices ambientales, como el suelo, por la técnica de NMP puede ser complicada ya que la población de estudio es muy heterogénea, puede incluir un importante número de microorganismos no cultivables y parte de ella puede verse limitada fácilmente por las condiciones de la prueba. Anteriormente otros autores ya han reportado resultados no satisfactorios al tratar de enumerar las poblaciones de degradadores de atrazina en suelo por la técnica de NMP (Ostrofsky et al., 2002).

La eliminación de atrazina y clorpirifós en la biomezcla, se supone está mediada principalmente por bacterias capaces de metabolizar este contaminante. Sin embargo, las

poblaciones capaces de degradar el contaminante, en este caso la ATZ o el CLP, pueden reducirse o aumentarse en respuesta al estímulo de la OTC en la biomezcla, así como por efecto de otras sustancias que pueden llegar a limitar su crecimiento. Thiele-Bruhn y Beck (2005) probaron que la OTC puede reducir significativamente el número de bacterias en suelos dependiendo de factores como la adsorción al suelo, la biodisponibilidad, el tiempo de exposición y la dosis del antibiótico. Esto se confirma con los ensayos de NMP realizados con las biomezclas, al comparar la población cuantificada a los cero días del ensayo en cada uno de los tratamientos. Se encontró que la OTC tanto en concentraciones de 10 mg kg^{-1} como de 50 mg kg^{-1} tuvo un efecto negativo en dichas poblaciones, puesto que estas se redujeron entre 7 y 2 logaritmos (ATZ y CLP respectivamente) respecto al tratamiento que no contenía OTC. Como se mencionó anteriormente, esto no es un comportamiento inesperado, anteriormente se ha visto que el tratamiento de suelos con OTC a concentraciones de 9.9 mg g^{-1} ha logrado disminuir el número de bacterias cultivables, aunque en ese caso no afectó la biomasa bacteriana total (Piotrowska-Seget et al., 2008); también se han encontrado efectos negativos sobre poblaciones específicas, como las bacterias fijadoras de nitrógeno, a concentraciones de 10, 60 y 200 mg kg^{-1} (Sun et al., 2016) similares a las estudiadas en esta investigación, A pesar de esto, no se han estudiado los efectos de la OTC en SBP para el tratamiento de plaguicidas y antibióticos de uso agrícola, en la cuantificación de las poblaciones de degradadores de ATZ o CLP. Los estudios se han enfocado principalmente en cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Castro-Gutiérrez et al., 2018; Tortella et al., 2013a), por lo que datos como los presentados en este estudio podrían ser de gran ayuda en la comprensión de las dinámicas microbianas en los SBP.

Al evaluar el efecto de la OTC sobre la población inicial de degradadores de ATZ, se observa que la cuantificación del NMP se reduce de 6 a 7 logaritmos, por lo que se puede decir que, contrario a lo que se creía analizando solo los resultados de eliminación, que la OTC efectivamente sí afecta a las poblaciones microbianas presentes en la biomezcla encargadas de eliminar los agroquímicos. A pesar de esto y considerando los resultados de la eliminación, pareciera ser que estas poblaciones son capaces de recuperarse y adaptarse a la presencia de los contaminantes rápidamente, un comportamiento similar se ha visto antes con microorganismos ambientales, Parada et al. (2019) por ejemplo,

demonstraron la recuperación de comunidades microbianas del suelo después de la exposición a ATZ junto con nanopartículas de cobre, puesto que a los 12 días la población de degradadores de atrazina se encuentra en su punto máximo cuantificado en el experimento y cae levemente a los 28 días cuando el estímulo de ATZ prácticamente ha desaparecido. Recolectando más frecuentemente datos de la cuantificación de estos microorganismos, sería posible obtener una mejor idea de cuánto tiempo requieren estas poblaciones para adaptarse al estímulo de OTC en la biomezcla.

Adicionalmente, al analizar los resultados por cada tratamiento aplicado, es posible concluir que en ausencia de OTC las bacterias cuantificables capaces de degradar ATZ se vieron ligeramente afectadas por sustancias presentes en la biomezcla al día 12, ya que la población se redujo un logaritmo respecto al día 0, probablemente producto del metabolismo de los contaminantes y la liberación de intermediarios tóxicos. Sin embargo, una vez que los agroquímicos iniciales fueron en su mayoría eliminados, la población aumentó, demostrando su adaptabilidad a las condiciones de su entorno. Otros autores han cuantificado las poblaciones de degradadores de ATZ en suelo por la técnica de NMP, obteniendo poblaciones alrededor de 3.2×10^4 , 3.5×10^3 , 4.6×10^3 y 1.5×10^6 NMP g^{-1} (Jayachandran et al., 1998; Dinamarca et al., 2007; Arthur et al., 1997; Goux et al., 2003), menores en varios logaritmos a las obtenidas en este estudio. Este resultado confirma lo que se ha dicho en múltiples ocasiones respecto a los SBP, que brindan las condiciones adecuadas para que los microorganismos encargados de eliminar contaminantes utilizadas en la agroindustria (Castillo et al., 2008; Castillo y Torstensson, 2007; Dunon et al., 2013).

En cuanto a la cuantificación de los microorganismos degradadores de CLP, al igual que como se mencionó anteriormente con la ATZ, hubo una disminución en el NMP g^{-1} de estos microorganismos en las biomezclas que contenían OTC versus el tratamiento que no contenía el antibiótico, sin embargo, en este caso corresponde a 2 y 3 logaritmos en los tratamientos de 10 mg kg^{-1} y 50 mg kg^{-1} respectivamente. A pesar que la disminución en la población cuantificable por este método fue menor, los microorganismos no se recuperaron en número al día 12 de ensayo, como sí ocurrió con la ATZ, pero continuaron eliminando los contaminantes, como se observa en la figura 13, esto podría deberse a reacciones de cometabolismo de otros microorganismos presentes en la biomezcla

Ahora bien, al analizar los resultados obtenidos en el tiempo para cada tratamiento particular, se observa que tanto en el tratamiento de OTC 10 mg kg^{-1} como en el de 50 mg kg^{-1} la población fue decayendo en el tiempo, con la disminución más radical al día 28. Este comportamiento podría explicarse debido a que después del día 12 los plaguicidas organofosforados ya habían sido eliminados casi por completo, con excepción del cadusafós, lo que podría conducir a nuevas adaptaciones de la comunidad microbiana, al estar ausente el estresor que favorecía a la población de degradadores de CLP (Xe et al., 2018b); incluso es probable que la disminución observada al día 12 también responda a este fenómeno, puesto que las vidas medias de degradación de la mayoría de los organofosforados estuvieron muy por debajo de los 10 días. Por otro lado, no se hizo el análisis de los metabolitos del CLP o de los otros plaguicidas, un factor que podría tener injerencia sobre los cambios en la población de degradadores, ya que como se ha mencionado antes, los productos intermediarios de la degradación pueden tener una toxicidad asociada (Tang et al., 2017), tal como se ha demostrado con el TCP, el principal metabolito de la degradación del CLP, el cuál es más tóxico incluso que el CLP y se ha asociado a efectos negativos en las poblaciones microbianas (Vischetti et al., 2007).

Estudios previos han demostrados que bacterias de los géneros *Pseudomonas* sp., *Bacillus pumilus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Flavobacterium* sp., *Proteus* sp. y *Acinetobacter* sp. están involucradas en las reacciones metabólicas para la degradación del CLP (Bhagobaty y Malik, 2008; Ahmad et al., 2012; Dubey y Fulekar, 2012; Pino y Peñuela, 2011), cuyo metabolismo se desarrolla en presencia de oxígeno y a temperaturas ambientales, condiciones a las que se desarrolló el presente ensayo.

Las poblaciones microbianas, tal como se ha demostrado en múltiples ocasiones, son muy complejas y diferentes unas de otras. Lo que se observó en este ensayo es la adaptación de los microorganismos a los estresores ambientales y la selección de las poblaciones con mejores posibilidades de sobrevivir (Xe et al., 2018b), sin embargo, aplicando otras técnicas como la secuenciación y la metagenómica, es posible obtener mucha más información que complementa los primeros hallazgos presentados en este estudio respecto a la dinámica de las poblaciones en los SBP y el efecto de los antibióticos sobre estas.

9. Conclusiones

El sistema de biopurificación de plaguicidas probado demostró ser eficiente para la eliminación de organofosforados y triazinas, obteniendo valores de DT₅₀ de los más bajos reportados hasta el momento para la mayoría de los plaguicidas. Adicionalmente, la coaplicación de OTC en la biomezcla, aumentó significativamente la DT₅₀ de los plaguicidas con mayor eliminación en la biomezcla, especialmente a concentraciones altas de OTC. A pesar de esto, las DT₅₀ incluso en presencia de OTC, se mantuvieron entre las más bajas reportadas en la literatura. Por su parte los resultados de ecotoxicidad fueron muy favorables para *D. magna* y *L. sativa*, sin embargo, las diferencias encontradas entre ambos organismos, recalca la importancia de evaluar la toxicidad en diferentes organismos de la cadena trófica. Por lo tanto, la biomezcla se recomienda para la eliminación de residuos de plaguicidas triazinas y organofosforados provenientes de las aguas de lavado de los equipos de aplicación.

En la biomezcla se demostró que hay presencia de poblaciones microbianas degradadoras de ATZ y de CLP, además de la presencia aparente del gen *atzA* la cuál podría confirmarse con una futura secuenciación de la muestra. Las pruebas para cuantificación por NMP y cuantificación de los genes de degradación deben afinarse y ajustarse mejor a las condiciones complejas de la biomezcla para obtener más resultados que permitan llegar a dilucidar más detalles de las poblaciones microbianas que participan en la degradación de organofosforados y triazinas en el SBP.

10. Referencias

1. **Abdelraheem WH, He X, Duan X, Dionysiou DD.** 2015. Degradation and mineralization of organic UV absorber compound 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA) using UV-254 nm/H₂O₂. *J. Hazard. Mater.* **282**: 233-240. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.07.041
2. **Ahmad F, Iqbal S, Anwar S, Afzal M, Islam E, Mustafa T, Khan QM.** 2012. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1. *J. Hazard. Mater.* **237**: 110-115. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.08.006
3. **Ahn JH, Lee SA, Kim SJ, You J, Han BH, Weon HY, Lee SW.** 2018. Biodegradation of organophosphorus insecticides with PS bonds by two *Sphingobium* sp. strains. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **132**: 59-65. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.05.006
4. **Alfaro MP.** 2011. Monitoreo de residuos de plaguicidas. En REPCar en Costa Rica - Experiencias exitosas para reducir el impacto de la agricultura sobre los ecosistemas costeros. Reduciendo el Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe. San José, Costa Rica.
5. **Alonso E, Jiménez-Fontana P.** 2015. Oportunidades, estabilidad y solvencias económicas. En Programa Estado de la Nación, Vigésimoprimer informe Estado de la Nación. San José, Costa Rica.
6. **Applied Biosystems.** 2008. Guide to performing relative quantitation of gene expression using real-time quantitative PCR [archivo PDF]. Recuperado de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042380.pdf
7. **Arthur EL, Anhalt JC, Anderson TA, Coats JR.** 1997. Enhanced degradation of deethylatrazine in an atrazine-history soil of Iowa. *J. Environ. Sci. Health B* **32**: 599-620. doi 10.1080/03601239709373105
8. **Ballantyne B, Marrs TC.** 1992. Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates, p 3-14. *En* Ballantyne B, Marrs TC (ed), *Clinical and experimental toxicology of organophosphates and carbamates*. 1era ed, Butterworth-Heinemann. Londres.

9. **Barchanska H, Sajdak M, Szczypka K, Swientek A, Tworek M, Kurek M.** 2017. Atrazine, triketone herbicides, and their degradation products in sediment, soil and surface water samples in Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **24**: 644-658. doi: 10.1007/s11356-016-7798-3
10. **Bergsveinson J, Perry BJ, Sheedy C, Braul L, Reedyk S, Gossen BD, Yost CK.** 2018. Identifying the core bacterial and fungal communities within four agricultural biobeds used for the treatment of pesticide rinsates. *J. Appl. Microbiol.* **125**: 1333-1342. doi: 10.1111/jam.14051
11. **Bhagobaty R, Malik A.** 2008. Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial area of western Uttar Pradesh, India. *Res. J. Microbiol.* **3**: 293-307. doi: 10.3923/jm.2008.293.307
12. **Blodgett R.** 2010. *Bacteriological Analytical Manual: Appendix 2 – Most Probable Number from serial dilutions.* Food and Drug Administration. Estados Unidos.
13. **Cai B, Han Y, Liu B, Ren Y, Jiang S.** 2003. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**:272–276. doi: 10.1046/j.1472-765x.2003.01307.x
14. **Cambroner-Heinrichs JC, Masís-Mora M, Quiros-Fournier JP, Lizano-Fallas V, Mata-Araya I, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2018. Removal of herbicides in a biopurification system is not negatively affected by oxytetracycline or fungally pretreated oxytetracycline. *Chemosphere* **198**: 198-203. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.122.
15. **Carazo-Rojas E, Pérez-Rojas G, Pérez-Villanueva M, Chinchilla-Soto C, Chin-Pampillo JS, Aguilar-Mora P, Alpízar-Marín M, Masís-Mora M, Rodríguez-Rodríguez CE, Vryzas Z.** 2018. Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. *Environ. Pollut.* **241**: 800-809. doi: 10.1016/j.envpol.2018.06.020

16. **Castillo M del P, Torstensson L.** 2007. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 5725-5733. doi: 10.1021/jf0707637
17. **Castillo M del P, Torstensson L, Stenström J.** 2008. Biobeds for environmental protection from pesticide use-A review. *J Agric Food Chem* **56**:6206–6219. doi: 10.1021/jf800844x
18. **Castillo-González H, Pérez-Villanueva M, Masís-Mora M, Castro-Gutiérrez V, Rodríguez-Rodríguez C.** 2017. Antibiotics of agricultural use do not affect the elimination of fungicides and may enhance the mineralization of chlorpyrifos in biomixtures used for pesticide degradation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **139**: 481-487. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.02.008
19. **Castro-Gutiérrez V, Masís-Mora M, Carazo-Rojas E, Mora-López M, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2018. Impact of oxytetracycline and bacterial bioaugmentation on the efficiency and microbial community structure of a pesticide-degrading biomixture. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**: 11787-11799. doi: 10.1007/s11356-018-1436-1.
20. **Castro-Gutiérrez V, Masís-Mora M, Carazo-Rojas E, Mora-López M, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2019. Fungal and Bacterial Co-Bioaugmentation of a Pesticide-Degrading Biomixture: Pesticide Removal and Community Structure Variations during Different Treatments. *Water Air Soil Pollut.* **230**: 247. doi: 10.1007/s11270-019-4282-y
21. **Ccancapa A, Masiá A, Navarro-Ortega A, Picó Y, Barceló D.** 2016. Pesticides in the Ebro River basin: occurrence and risk assessment. *Environ. Pollut.* **211**: 414-424. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.059
22. **Cheng G, Shapir N, Sadowsky MJ, Wackett LP.** 2005. Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:4437–4445. doi: 10.1128/AEM.71.8.4437-4445.2005
23. **Cheng TC, DeFrank JJ.** 2000. Hydrolysis of Organophosphorus Compounds by Bacterial Prolidases, p 243–261. En Zwanenburg B, Mikolajczyk M, Kielbasinski P. (ed) *Enzymes in action green solutions for chemical problems*, vol 33. Kluwer Academic, Dordrecht.

24. **Cheng TC, Harvey SP, Chen GL.** 1996. Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1636–1641.
25. **Chin-Pampillo JS, Ruiz-Hidalgo K, Masís-Mora M, Carazo-Rojas E, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2015a. Adaptation of biomixtures for carbofuran degradation in on-farm biopurification systems in tropical regions. *Environ Sci Pollut Res.* **22**:9839–9848. doi: 10.1007/s11356-015-4130-6
26. **Chin-Pampillo JS, Ruiz-Hidalgo K, Masís-Mora M, Carazo-Rojas E, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2015b. Design of an optimized biomixture for the degradation of carbofuran based on pesticide removal and toxicity reduction of the matrix. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **22**:19184–19193. doi: 10.1007/s11356-015-5093-3
27. **Chu B, Eivazi F.** 2018. Enhanced dissipation of selected herbicides in a simulated organic matrix biobed: A system to control on-farm point-source pollution. *J. Environ. Qual.* **47**: 221-227. doi: 10.2134/jeq2016.04.0124
28. **Cook AM, Hütter R.** 1981. s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **29**:1135-1143. doi: 10.1021/jf00108a009
29. **Cooper RJ, Fitt P, Hiscock KM, Lovett AA, Gumm L, Dugdale SJ, Rambohul J, Williamson A, Noble L, Beamish J, Hovesen P.** 2016. Assessing the effectiveness of a three-stage on-farm biobed in treating pesticide contaminated wastewater. *J. Environ. Manage.* **181**:874-882. doi: 10.1016/j.jenvman.2016.06.047
30. **Coppola L, Castillo M d P, Monaci E, Vischetti C.** 2007. Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions. *J. Agric. Food Chem.* **55**:396–401. doi: 10.1021/jf062744n
31. **Corrales L, Chacón K.** 2015. Armonía con la naturaleza. En Programa Estado de la Nación, Vigésimoprimer informe Estado de la Nación. San José, Costa Rica.
32. **Cycoń M, Żmijowska A, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z.** 2013. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove

- other organophosphorus pesticides from soils. *J. Environ. Manage.* **117**: 7-16. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.12.031
- 33. de Sosa LL, Glanville HC, Marshall MR, Williams AP, Abadie M, Clark IM, Blaud A. Jones DL.** 2018. Spatial zoning of microbial functions and plant-soil nitrogen dynamics across a riparian area in an extensively grazed livestock system. *Soil Biol. Biochem.* **120**: 153-164. doi: 10.1016/j.soilbio.2018.02.004
- 34. de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP.** 1996. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *J. Bacteriol.* **178**: 4894-4900. doi: 10.1128/jb.178.16.4894-4900.1996
- 35. Delgado-Moreno L, Bazhari S, Nogales R, Romero E.** 2019. Innovative application of biobed bioremediation systems to remove emerging contaminants: Adsorption, degradation and bioaccessibility. *Sci. Total Environ.* **651**:990-997. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.268
- 36. Devers M, Soulas G, Martin-Laurent F.** 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Methods* **56**:3–15. doi: 10.1016/j.mimet.2003.08.015
- 37. Dinamarca MA, Cereceda-Balic F, Fadic X, Seeger M.** 2007. Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration and tetrazolium-salt detection. *Int. Microbiol.* **10**: 209-215. doi: 10.2436/20.1501.01.29
- 38. Douglass JF, Radosevich M, Tuovinen OH.** 2016. Biomineralization of atrazine and analysis of 16S rRNA and catabolic genes of atrazine degraders in a former pesticide mixing site and a machinery washing area. *J. Soils. Sediments* **16**: 2263-2274. doi: 10.1007/s11368-016-1416-3
- 39. Dubey KK, Fulekar MH.** 2012. Chlorpyrifos bioremediation in Pennisetum rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1715-1725. doi: 10.1007/s11274-011-0982-1

40. **Dunon V, Sniegowski K, Bers K, Lavigne R, Smalla K, Springael D.** 2013. High prevalence of IncP-1 plasmids and IS 1071 insertion sequences in on-farm biopurification systems and other pesticide-polluted environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**: 415-431. doi: 10.1111/1574-6941.12173
41. **Eaton RW, Karns JS.** 1991. Cloning and analysis of *s*-triazine catabolic genes from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. *J. Bacteriol.* **173**: 1215–1222. doi: 10.1128/jb.173.3.1215-1222.1991
42. **Echeverría-Saenz S, Mena F, Pinnock M, Ruepert C, Solano K, De la Cruz E, Sanchez-Avila J, Lacorte S, Barata C.** 2012. Environmental hazards of pesticides from pineapple crop production in the Río Jimenez watershed (Caribbean Coast, Costa Rica). *Sci. Total Environ.* **440**: 106-114. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.092
43. **El Sebaï T, Devers-Lamrani M, Changey F, Rouard N, Martin-Laurent F.** 2011. Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain. *Int. Biodeter. Biodegrad.* **65**:1249–1255. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.05.011
44. **Ellingsøe P, Johnsen K.** 2002. Influence of soil sample sizes on the assessment of bacterial community structure. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 1701-1707. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00156-6
45. **EPA.** 2001. Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual (EPA/823/B-01/002), Office of Water (4305), EPA, Washington, DC.
46. **EPA.** 2013. Atrazine updates, EPA, Washington, DC.
47. **Etchegoyen MA, Ronco AE, Almada P, Abelando M, Marino DJ.** 2017. Occurrence and fate of pesticides in the Argentine stretch of the Paraguay-Parana basin. *Environ. Monit. Assess.* **189**: 63. doi: 10.1007/s10661-017-5773-1
48. **Ewence A, Brescia S, Johnson I, Rumsby PC.** 2015. An approach to the identification and regulation of endocrine disrupting pesticides. *Food Chem. Toxicol.* **78**:214–220. doi: 10.1016/j.fct.2015.01.011
49. **Feld L, Hjelmsø MH, Nielsen MS, Jacobsen AD, Rønn R, Ekelund F, Krogh PH, Strobel BW, Jacobsen CS.** 2015. Pesticide side effects in an agricultural soil

- ecosystem as measured by *amoA* expression quantification and bacterial diversity changes. PLoS One **10**: e0126080. doi: 10.1371/journal.pone.0126080
- 50. Fernandez MV, Gardinali PR.** 2016. Risk assessment of triazine herbicides in surface waters and bioaccumulation of Irgarol and M1 by submerged aquatic vegetation in Southeast Florida. Sci. Total Environ. **541**: 1556-1571. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.09.035
- 51. Fogg P, Boxall AB, Walker A.** 2003a. Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticide mixtures. J. Agric. Food Chem. **51**: 5344-5349. doi: 10.1021/jf030060z
- 52. Fogg P, Boxall ABA, Walker A, Jukes AA.** 2003b. Pesticide degradation in a “biobed” composting substrate. Pest Manag. Sci. **59**:527–537. doi: 10.1002/ps.685
- 53. Galloway T, Handy R.** 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. Ecotoxicology **12**:345–363. doi: 10.1023/a:1022579416322
- 54. Ghosh PG, Sawant NA, Patil SN, Aglave BA.** 2010. Microbial Biodegradation of Organophosphate Pesticides. International Journal of Biotechnology and Biochemistry **6**: 871-876.
- 55. Gikas GD, Pérez-Villanueva M, Tsioras M, Alexoudis C, Pérez-Rojas G, Masís-Mora M, Lizano-Fallas V, Rodríguez-Rodríguez CE, Vryzas Z, Tsihrintzis VA.** 2018. Low-cost approaches for the removal of terbuthylazine from agricultural wastewater: Constructed wetlands and biopurification system. Chem. Eng. J. **335**: 647-656. doi:10.1016/j.cej.2017.11.031
- 56. Gobierno de la República de Costa Rica.** 2018. Plan Nacional Resistencia Antimicrobiana 2018-2025. San José, Costa Rica.
- 57. Gomez-Eyles JL, Svendsen C, Lister L, Martin H, Hodson ME, Spurgeon DJ.** 2009. Measuring and modeling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. Ecotox. Environ. Safe **72**: 71-79. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.07.006
- 58. Goux S, Shapir N, El Fantroussi S, Lelong S, Agathos SN, Pussemier L.** 2003. Long-term maintenance of rapid atrazine degradation in soils inoculated with atrazine degraders. Water Air Soil Pollut.: Focus **3**: 131-142. doi: 10.1023/A:1023998222016

- 59. Grube A, Donaldson D, Kiely T, Wu L.** 2011. Pesticide Industry Sales and Usage Report: 2006 and 2007 Market Estimates. EPA, Washington, DC.
- 60. Hernández AF, Parrón T, Tsatsakis AM, Requena M, Alarcón R, López-Guarnido O.** 2013. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology* **307**: 136-145. doi: 10.1016/j.tox.2012.06.009
- 61. Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG.** 2002. Identification of an *opd* (Organophosphate Degradation) Gene in an *Agrobacterium* Isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3371–3376. doi: 10.1128/aem.68.7.3371-3376.2002
- 62. Horvath RS.** 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* **36**: 146.
- 63. Huete-Soto A, Castillo-González H, Masís-Mora M, Chin-Pampillo JS, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2017a. Effects of oxytetracycline on the performance and activity of biomixtures: Removal of herbicides and mineralization of chlorpyrifos. *J. Hazard. Mater.* **321**:1-8. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.08.078
- 64. Huete-Soto A, Masís-Mora M, Lizano-Fallas V, Chin-Pampillo JS, Carazo-Rojas E, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2017b. Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: detoxification and effect of oxytetracycline. *Chemosphere* **169**: 558-567. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.106
- 65. Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF.** 2006. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2221-2225. doi: 10.1128/AEM.72.3.2221-2225.2006
- 66. İnceoğlu Ö, Hoogwout EF, Hill P, van Elsas JD.** 2010. Effect of DNA extraction method on the apparent microbial diversity of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 3378-3382. doi: 10.1128/AEM.02715-09
- 67. Jarvis B, Wilrich C, Wilrich PT.** 2010. Reconsideration of the derivation of Most Probable Numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1660-1667. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04792.x

- 68. Jayachandran K, Stolpe NB, Moorman TB, Shea PJ.** 1998. Application of ¹⁴C-most-probable-number technique to enumerate atrazine-degrading microorganisms in soil. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 523-529. doi: 10.1016/S0038-0717(97)00137-5
- 69. Jiménez-Fontana P.** 2019. Balance de oportunidades, estabilidad y solvencia económicas. En Programa Estado de la Nación, Balance 2019-2. San José, Costa Rica.
- 70. Jiménez-Gamboa D, Castro-Gutiérrez V, Fernández-Fernández E, Briceño-Guevara S, Masís-Mora M, Chin-Pampillo JS, Mora-López M, Carazo-Rojas E, Rodríguez-Rodríguez C.** 2018. Expanding the application scope of on-farm biopurification systems: effect and removal of an antibiotic of agricultural use in a biomixture. *J. Hazard. Mater.* **342**: 553-560. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.08.059
- 71. Johnsen AR, Binning PJ, Aamand J, Badawi N, Rosenbom AE.** 2013. The Gompertz function can coherently describe microbial mineralization of growth-sustaining pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **47**: 8508-8514. doi: 10.1021/es400861v
- 72. Johnson GR, Spain JC.** 2003. Evolution of catabolic pathways for synthetic compounds: bacterial pathways for degradation of 2,4-dinitrotoluene and nitrobenzene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:110–123. doi: 10.1007/s00253-003-1341-4
- 73. Karanasios E, Papadi-Psyllou A, Karpouzas DG, Tsiropoulos NG.** 2012a. Optimization of biomixture composition and water management for maximum pesticide dissipation in peat-free biobeds. *J. Environ. Qual.* **41**:1787–1795. doi: 10.2134/jeq2012.0093
- 74. Karanasios E, Tsiropoulos NG, Karpouzas DG.** 2012b. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation.* **23**:787-802. doi: 10.1007/s10532-012-9571-8
- 75. Karas PA, Perruchon C, Karanasios E, Papadopoulou ES, Manthou E, Sitra S, Ehaliotis C, Karpouzas DG.** 2016. Integrated biodepuration of pesticide-contaminated wastewaters from the fruit-packaging industry using biobeds:

- Bioaugmentation, risk assessment and optimized management. *J. Hazard. Mater.* **320**: 635-644. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.07.071
- 76. Karns JS, Eaton RW.** 1997. Genes Encoding *s*-Triazine Degradation Are Plasmid-Borne in *Klebsiella pneumoniae* Strain 99. *J Agric Food Chem* **45**: 1017–1022. doi: 10.1021/jf960464+
- 77. Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, Barnes WM.** 2009. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids. Res.* **37**: 40. doi: 10.1093/nar/gkn1055
- 78. Knight JD, Cessna AJ, Ngombe D, Wolfe TM.** 2016. Mineralisation and degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt in a biobed matrix and in topsoil. *Pest. Manag. Sci.* **72**: 1965-1976. doi: 10.1002/ps.4238
- 79. Kong WD, Zhu YG, Liang YC, Zhang J, Smith FA, Yang M.** 2007. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Environ. Pollut.* **147**: 187-193. doi: 10.1016/j.envpol.2006.08.016
- 80. Krutz JL, Shaner DL, Weaver MA, Webb RM, Zablotowicz RM, Reddy KN, Huang Y, Thomson SJ.** 2010. Agronomic and environmental implications of enhanced *s*-triazine degradation. *Pest Manag. Sci.* **66**: 461–481. doi: 10.1002/ps.1909
- 81. Lehmicke LG, Williams RT, Crawford R.** 1979. ¹⁴C-Most-Probable-Number method for enumeration of active heterotrophic microorganisms in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**: 644-649.
- 82. Lewis KA, Tzilivakis J, Warner D, Green A.** 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **22**: 1050-1064. doi: 10.1080/10807039.2015.1133242
- 83. Lizano-Fallas V, Masís-Mora M, Espinoza-Villalobos D, Lizano-Brenes M, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2017. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. *Chemosphere* **182**: 106-113. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.147

- 84. Malá Z, Gebauer P.** 2017. Capillary moving-boundary isotachopheresis with electrospray ionization mass-spectrometric detection and hydrogen ion used as essential terminator: Methodology for sensitive analysis of hydroxyderivatives of s-triazine herbicides in waters. *J. Chromatogr. A* **1518**: 97-103. doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.074
- 85. Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, Wing R, Sadowsky MJ.** 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* **183**: 5684–5697. doi: 10.1128/JB.183.19.5684-5697.2001
- 86. Masís-Mora M, Lizano-Fallas V, Tortella G, Beita-Sandí W, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2019. Removal of triazines, triazoles and organophosphates in biomixtures and application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. *Chemosphere* **233**: 733-743. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.001
- 87. Meleiro-Porto AL, Zelayarán-Melgar G, Consiglio-Kasemodel M, Nitschke M.** 2011. Biodegradation of Pesticides, p 407-438. En Stoycheva, M. (ed) *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. Intech, Rijeka, Croacia. doi: 10.5772/950 ISBN: 978-953-307-459-7
- 88. Merino L, Chacón K.** 2018. Armonía con la naturaleza. En Programa Estado de la Nación, Informe 2018. San José, Costa Rica.
- 89. Mets L, Thiel A.** 1989. Biochemistry and genetic control of the photosystem-II herbicide target site, p 1-20. En Böger P, Sandmann G (ed), *Target sites of herbicide action*. 1era ed. CRC Press. USA.
- 90. Monard C, Martin-Laurent F, Lima O, Devers-Lamrani M, Binet F.** 2013. Estimating the biodegradation of pesticide in soils by monitoring pesticide-degrading gene expression. *Biodegradation*. **24**: 203–213. doi: 10.1007/s10532-012-9574-5
- 91. Moran AC, Müller A, Manzano M, Gonzalez B.** 2006. Simazine treatment history determines a significant herbicide degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 26-35. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02990.x

- 92. Mulbry WW, Zhu H, Nour SM, Topp E.** 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**:75–79. doi: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10989.x
- 93. O’Neil MJ.** 2006. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological, 14ava ed. Merck, Whitehouse Station, Nueva Jersey. doi: 10.1021/ja069838y
- 94. Ostrofsky EB, Robinson JB, Traina SJ, Tuovinen OH.** 2002. Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biol. Biochem.* **34**: 1449-1459. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00089-5
- 95. Otieno PO, Lalah JO, Virani M, Jondiko IO, Schramm KW.** 2010. Carbofuran and its toxic metabolites provide forensic evidence for Furadan exposure in vultures (*Gyps africanus*) in Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **84**: 536-544. doi: 10.1007/s00128-010-9956-5
- 96. Papadopoulos NG, Gikas E, Zalidis G, Tsarbopoulos A.** 2012. Determination of herbicide terbuthylazine and its major hydroxy and dealkylated metabolites in constructed wetland sediments using solid phase extraction and high performance liquid chromatography-diode array detection. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **92**: 1429-1442. doi: 10.1080/03067319.2011.561337
- 97. Papen H, Von Berg R.** 1998. A most probable number method (MPN) for the estimation of cell numbers of heterotrophic nitrifying bacteria in soil. *Plant and soil*, **199**: 123-130. doi: 10.1023/A:1004243810473
- 98. Parada J, Rubilar O, Sousa DZ, Martínez M, Fernández-Baldo MA, Tortella GR.** 2019. Short term changes in the abundance of nitrifying microorganisms in a soil-plant system simultaneously exposed to copper nanoparticles and atrazine. *Sci. Total Environ.* **670**: 1068-1074. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.221
- 99. Piotrowska-Seget Z, Engel R, Nowak E, Kozdrój J.** 2008. Successive soil treatment with captan or oxytetracycline affects non-target

- microorganisms. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 2843. doi: 10.1007/s11274-008-9815-2
- 100.** **Pino N, Peñuela G.** 2011. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeter. Biodegr.* **65**: 827-831. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.06.001
- 101.** **Pirsaheb M, Hossini H, Asadi F, Janjani H.** 2017. A systematic review on organochlorine and organophosphorus pesticides content in water resources. *Toxin rev.* **36**: 210-221. doi: 10.1080/15569543.2016.1269810
- 102.** **Pope C, Karanth S, Liu J.** 2005. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: Uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Phar.* **19**: 433-446. doi: 10.1016/j.etap.2004.12.048.
- 103.** **Pro J, Ortiz JA, Boleas S, Fernández C, Carbonell G, Tarazona JV.** 2003. Effect assessment of antimicrobial pharmaceuticals on the aquatic plant *Lemna minor*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 0290-0295. doi: 10.1007/s00128-002-0208-1
- 104.** **Ramírez F.** 2010. Importación de plaguicidas en Costa Rica: período 2007 – 2009. Informe elaborado para el proyecto REPCar. IRET-UNA. Heredia. 27 p.
- 105.** **Ramírez F, Chaverri F, De la Cruz E, Wesseling C, Castillo L, Bravo V.** 2009. Importación de Plaguicidas en Costa Rica: período 1977 – 2006. Serie de Informes Técnicos IRET-UNA, N° 6. Heredia, Costa Rica. 58 p.
- 106.** **Ramírez JA, Lacasaña Y.** 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch. Prev. Riesgos Labor.* **4**: 67–75.
- 107.** **Rivero A, Niell S, Cerdeiras MP, Heinzen H, Cesio MV.** 2016. Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. *Talanta* **153**:17–22. doi: 10.1016/j.talanta.2016.02.025
- 108.** **Robe P, Nalin R, Capellano C, Vogel T, Simonet P.** 2003. Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* **39**:183–190. doi: 10.1016/S1164-5563(03)00033-5

- 109. Rodríguez-Rodríguez CE, Castro-Gutiérrez V, Chin-Pampillo JS, Ruiz-Hidalgo K.** 2013. On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS Microbiol. Lett.* **345**:1–12. doi: 10.1111/1574-6968.12161
- 110. Rodríguez-Sánchez C.** 2008. Oxytetracycline and Gentamicin: Two Clinically relevant Antimicrobials Widely Used by Costa Rican Farmers. Implications of Their Use Outside Clinical Settings and Request for Action. *Rev. Médica la Univ. Costa Rica* **2**: 64–71.
- 111. Rojas-Cabezas E.** 2016. Prohibición y restricción en el uso y comercialización de plaguicidas agrícolas en Costa Rica. *Agron. Costarricense* **40**: 89-105.
- 112. Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Harry M.** 2001. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Appl. Soil Ecol.* **18**: 47–60. doi: 10.1016/S0929-1393(01)00149-4
- 113. Rousidou K, Chanika E, Georgiadou D, Soueref E, Katsarou D, Kolovos P, Ntougias S, Tourna M, Tzortzakakis EA, Karpouzas DG.** 2016. Isolation of oxamyl-degrading bacteria and identification of *cehA* as a novel oxamyl hydrolase gene. *Front. Microbiol.* **7**:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2016.00616
- 114. Ruiz-Hidalgo K, Chin-Pampillo JS, Masís-Mora M, Carazo R. E, Rodríguez-Rodríguez CE.** 2014. Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures: From mineralization to toxicity reduction. *Process. Biochem.* **49**: 2266–2271. doi: 10.1016/j.procbio.2014.10.006
- 115. Sabik H, Jeannot R, Rondeau B.** 2000. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters. *J. Chromatogr. A* **885**: 217–236. doi: 10.1016/S0021-9673(99)01084-5
- 116. Sagarkar S, Bhardwaj P, Storck V, Devers-Lamrani M, Martin-Laurent F, Kapley A.** 2016. s-triazine degrading bacterial isolate *Arthrobacter* sp. AK-YN10, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 903–913. doi: 10.1007/s00253-015-6975-5

- 117. Sagova-Mareckova M, Cermak L, Novotna J, Plhackova K, Forstova J, Kopeccky J.** 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2902-2907. doi: 10.1128/AEM.02161-07
- 118. Sajjaphan K, Shapir N, Wackett LP, Palmer M, Blackmon B, Tomkins J, Sadowsky MJ.** 2004. *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4402-4407. doi: 10.1128/AEM.70.7.4402-4407.2004
- 119. Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (SEPSA).** 2015. Área de Estudios Económicos e Información - AEEI. Indicadores Macroeconómicos Sector Agroalimentario.
- 120. Servicio Fitosanitario del Estado (SFE).** 2017. Insumosys: Registro de plaguicidas. Consultado el 22 de febrero de 2017 en <http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Seguridad/Home.aspx>.
- 121. Siddavattam D, Khajamohiddin S, Manavathi B, Pakala SB, Merrick M.** 2003. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (*opd*) gene cluster found in *Flavobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2533-2539. doi: 10.1128/AEM.69.5.2533-2539.2003
- 122. Singh BK.** 2008. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:156-164. doi: 10.1038/nrmicro2050
- 123. Singh B, Singh K.** 2016. Microbial degradation of herbicides. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**: 245-261. doi: 10.3109/1040841X.2014.929564
- 124. Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R, Tripathi KK.** 1999. Biochemical and Molecular Basis of Pesticide Degradation by Microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**:197-225. doi: 10.1080/0738-859991229242
- 125. Singh BK, Walker A.** 2006. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:428-471. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x

- 126. Smith CJ, Nedwell DB, Dong LF, Osborn AM.** 2006. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environ. Microbiol.* **8**: 804-815. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00963.x
- 127. Sniegowski K, Bers K, Ryckeboer J, Jaeken P, Spanoghe P, Springael D.** 2012. Minimal pesticide-primed soil inoculum density to secure maximum pesticide degradation efficiency in on-farm biopurification systems. *Chemosphere* **88**: 1114-1118. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.04.057
- 128. Sniegowski K, Bers K, Van Goetem K, Ryckeboer J, Jaeken P, Spanoghe P, Springael D.** 2011. Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification systems by bioaugmentation with pesticide-primed soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76**: 64–73. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01031.x
- 129. Sogorb MA, Vilanova E.** 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* **128**: 215–228. doi: 10.1016/s0378-4274(01)00543-4
- 130. Soulas G, Lagacherie B.** 2001. Modelling of microbial degradation of pesticides in soils. *Biol. Fertil. Soils.* **33**: 551-557. doi: 10.1007/s003740100363
- 131. Spliid NH, Helweg A, Heinrichson K.** 2006. Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere* **65**: 2223-2232. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.049
- 132. Stockwell VO, Duffy B.** 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. Sci. Tech. OIE.* **31**: 199-210. doi: 10.20506/rst.31.1.2104
- 133. Sun J, Qian X, Gu J, Wang X, Gao H.** 2016. Effects of oxytetracycline on the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria during cattle manure composting. *Bioresour. Technol.* **216**: 801-807. doi: 10.1016/j.biortech.2016.05.060
- 134. Tang W, Ji H, Hou X.** 2017. Research progress of microbial degradation of organophosphorus pesticides. *Prog. Appl. Microbiol.* **1**: 29-35.
- 135. Thiele-Bruhn S, Beck IC.** 2005. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere* **59**: 457–465. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.023

- 136. Topp E.** 2001. A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation. *Biol. Fertil. Soils*. **33**: 529-534. doi: 10.1007/s003740100371
- 137. Tortella GR, Mella-Herrera RA, Sousa DZ, Rubilar O, Acuna JJ, Briceño G, Diez MC.** 2013a. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. *J. Hazard Mater.* **260**: 459-467. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.05.059.
- 138. Tortella GR, Mella-Herrera RA, Sousa DZ, Rubilar O, Briceño G, Parra L, Diez MC.** (2013b). Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. *Chemosphere* **93**: 1084-1093. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.05.084
- 139. Tortella GR, Rubilar O, Stenström J, Cea M, Briceño G, Quiroz A, Diez MC, Parra L.** (2013c). Using volatile organic compounds to enhance atrazine biodegradation in a biobed system. *Biodegradation* **24**: 711-720. doi: 10.1007/s10532-013-9619-4
- 140. Urrutia C, Rubilar O, Tortella GR, Diez MC.** 2013. Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a biopurification system with alternatives lignocellulosic wastes. *Chemosphere* **92**: 1361-1366. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.088
- 141. Ursi JP, Ursi D, Ieven M, Pattyn SR.** 1992. Utility of an internal control for the polymerase chain reaction: application to detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Apmis* **100**: 635-639. doi: 10.1111/j.1699-0463.1992.tb03978.x
- 142. Valls-Cantenys C, Scheurer M, Iglesias M, Sacher F, Brauch H-J, Salvadó V.** 2016. A sensitive multi-residue method for the determination of 35 micropollutants including pharmaceuticals, iodinated contrast media and pesticides in water. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**: 6189–6200. doi: 10.1007/s00216-016-9731-5

- 143. Vammen K, Vaux H, Roldán G, González E, Tundisi J, Izurieta R, Fabrega J.** 2019. Water Quality in the Americas. Risks and Opportunities. México, Inter-American Network of Academies of Sciences.
- 144. Vega E.** 2008. Plaguicidas prohibidos y restringidos en Costa Rica. Unidad de Registro. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica.
- 145. Verhagen P, Destino C, Boon N, De Gelder L.** 2015. Spatial heterogeneity in degradation characteristics and microbial community composition of pesticide biopurification systems. *J. Appl. Microbiol.* **118**: 368–378. doi: 10.1111/jam.12716
- 146. Vidaver AK.** 2002. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin. Infect. Dis.* **34**: S107-S110. doi: 10.1086/340247
- 147. Vischetti C, Coppola L, Monaci E, Cardinali A, Castillo MDP.** 2007. Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agron. Sustain. Dev.* **27**: 267-272. doi: 10.1051/agro:2007020
- 148. Vischetti C, Monaci E, Cardinali A, Casucci C, Perucci P.** 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* **72**:1739-1743. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.04.065
- 149. Waite DT, Cessna AJ, Grover R, Kerr LA, Snihura AD.** 2002. Environmental concentrations of agricultural herbicides: 2,4-d and triallate. *J. Environ. Qual.* **31**:129–144. doi: 10.2134/jeq2002.1290
- 150. Wang H, Qi J, Xiao D, Wang Z, Tian K.** 2017. A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. *Soil Biol. Biochem.* **106**: 109-118. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.12.011
- 151. Wang L, Samac DA, Shapir N, Wackett LP, Vance CP, Olszewski NE, Sadowsky MJ.** 2005. Biodegradation of atrazine in transgenic plants expressing a modified bacterial atrazine chlorohydrolase (*atzA*) gene. *Plant. Biotechnol. J.* **3**: 475-486. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00138.x
- 152. Wang N, Guo X, Yan Z, Wang W, Chen B, Ge F, Ye B.** 2016. A comprehensive analysis on spread and distribution characteristic of antibiotic

resistance genes in livestock farms of southeastern China. *PloS One*, **11**: e0156889. doi: 10.1371/journal.pone.0156889

- 153. Woomer L.** 1994. Most Probable Number Counts. p 59-79. En Weaver, W. (ed) *Methods of soil Analysis: Microbiological and biochemical properties*, Part 2. Soil Science Society of America. Estados Unidos.
- 154. Xu G, Li Y, Zheng W, Peng X, Li W, Yan Y.** 2007. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. *Biotechnol. Lett.* **29**: 1469-1473. doi: 10.1007/s10529-007-9444-0
- 155. Ye X, Dong F, Lei X.** 2018. Microbial resources and ecology-microbial degradation of pesticides. *Nat. Resour. Conserv. Res.* **1**: 22-28. doi: 10.24294/nrcr.v1i1.242
- 156. Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Li H, Ren Y, Li J, Wang J, Yang H.** 2013. Isolation and characterization of carbendazim-degrading *Rhodococcus erythropolis* djl-11. *PLoS One* **8**: e74810. doi: 10.1371/journal.pone.0074810

Anexos

Anexo 1. Resultados de pruebas preliminares para la ejecución del qPCR

Se presentan resultados que incluyen pruebas previas realizadas para seleccionar la mejor metodología de extracción y los genes e imprimadores que fueron utilizados en el PCR tiempo real.

En la figura A1 se muestra un gel realizado a los productos de PCR punto final usado para definir las condiciones de extracción de ADN a utilizar para las muestras de la biomezcla, ya que el kit utilizado incluye diferentes opciones según el tipo de suelo.

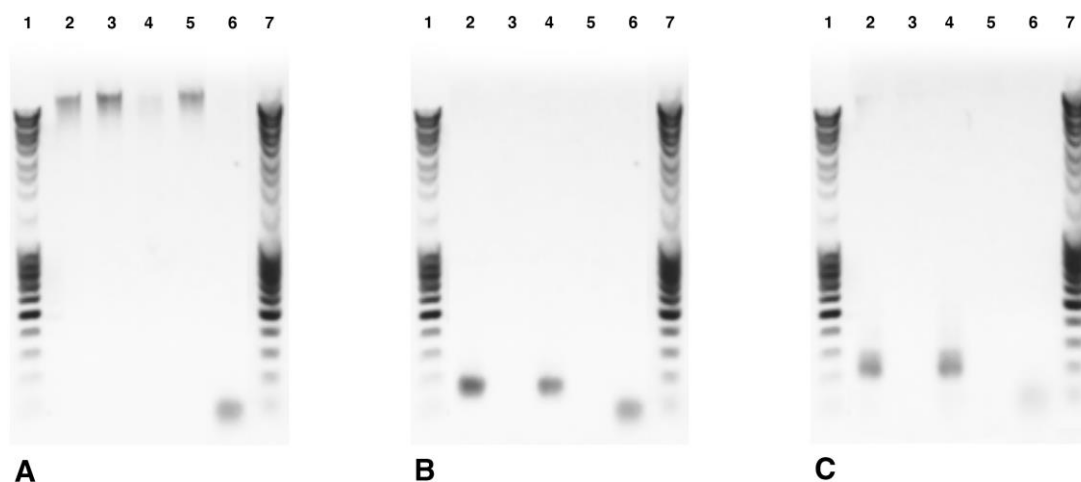


Figura A1. Productos de PCR punto final obtenidos en diferentes condiciones de trabajo. A. ADNs obtenidos con los diferentes métodos de extracción recomendados por el fabricante, A1 y A7: marcador de peso molecular (MPM); A2: ADN obtenido con el método 1 de extracción; A3: ADN obtenido con el método 2 de extracción; A4: ADN obtenido con el método 3 de extracción; A5: ADN obtenido con el método 4 de extracción; A6: control negativo; B. ADN amplificado con el 16S Wang; C. ADN amplificado con el 16S Monard. Para B y C las muestras corresponden a 1 y 7: MPM; 2: ADN método 1; 3: ADN método 2; 4: ADN método 3; 5: ADN método 4; 6: control negativo.

De la figura anterior se obtuvo que el *buffer* SL1 de los dos posibles aportados en el kit, fue el que presentó mejores resultados de extracción, los cuales mejoraron al ser aplicados

junto con el potenciador aportado por el kit, esta combinación (SL1+potenciador) es la que se representa en el método 2, por lo que esta fue la metodología seleccionada para la extracción de las muestras para el qPCR.

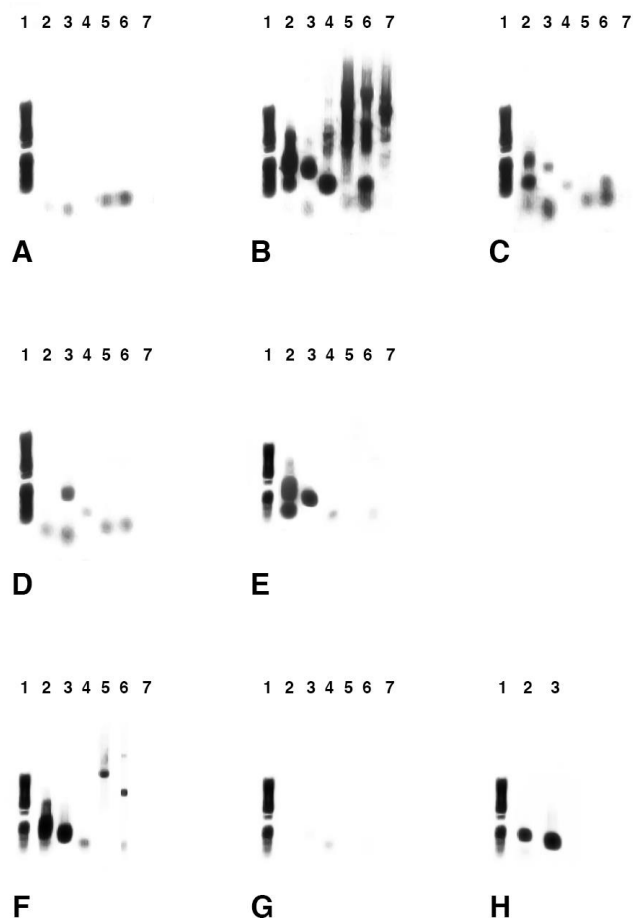


Figura A2. Productos de PCR punto final de los tratamientos B+M, B+M+OTC10 y B+M+OTC50 en el tiempo. A: Día 0, B+M; B: Día 0, B+M+OTC10; C: Día 0, B+M+OTC50; D: Día 11, B+M+OTC10; E: Día 11, B+M+OTC50; F: Día 28, B+M+OTC10; G: Día 28, B+M+OTC50; H: Controles positivos; 1: MPM 100 pb; 2: 16S Monard; 3: 16S Wang; 4: *atzA*; 5: *atzD*; 6: *opd*; 7: *opdA*.

Cuadro A1. Calidad del ADN purificado de las bandas para usar como controles positivos en el qPCR

Muestra	Cuantificación Nanodrop (ng μL^{-1})	Relación 260/280	Cuantificación fluorímetro (ng μL^{-1})
Control 16S Wang	11.7	2.25	6.700
Control 16S Monard	18.4	1.97	5.500
Control 23S	11	1.97	3.740
Control <i>atzA</i>	8	2	2.520
Control <i>opd</i>	4.4	1.71	0.725
Control de <i>E. coli</i> ATCC 25922	19.4	1.54	NA

Cuadro A2. Cuantificación en fluorímetro del ADN de las muestras para qPCR

Muestra	Cuantificación fluorímetro (ng μL^{-1})
Día 0, B+M	38.0
Día 0, B+M+OTC10	120.0
Día 0, B+M+OTC50	124.0
Día 11, B+M	8.3
Día 11, B+M+OTC10	14.0
Día 11, B+M+OTC50	12.0
Día 28, B+M+OTC10	14.0
Día 28, B+M+OTC50	18.0

Cuadro A3. Pendiente y eficiencia de las curvas de calibración realizadas con los genes *housekeeping*

Gen <i>housekeeping</i>	Pendiente	Eficiencia
16S Wang	-4.406	68.631
16S Monard	-4.354	69.705
23S	-6.606	41.701