

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DISEÑO DE UN SISTEMA EN FASE LÍQUIDA CAPAZ DE DEGRADAR
INSECTICIDAS DEL GRUPO DE LOS NEONICOTINOIDES POR MEDIO DE UN
CONSORCIO MICROBIANO

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

GABRIEL ESTEBAN RODRÍGUEZ CASTILLO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

DEDICATORIA

A mis padres, por su amor y apoyo siempre.

A mis profesores, por su mentoría y ejemplo.

A mis amigos y amigas, por su compañía sincera en cada etapa de este camino.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo y la colaboración de múltiples personas e instituciones que contribuyeron a lo largo de las diferentes etapas del proyecto.

A los profesores, investigadores, técnicos y amigos del **Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA)**, del **Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM)** y del **Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot)**, por su guía científica, su tiempo y su disposición para compartir conocimientos que enriquecieron enormemente este trabajo.

A los asistentes, personal administrativo y de limpieza de estos centros, por su apoyo cotidiano, su amabilidad y compromiso con la investigación; su labor fue indispensable para el desarrollo de este proyecto.

A mis **compañeros de clase y tesarios que compartieron laboratorio**, gracias por su compañía, por las conversaciones, el intercambio de ideas y el apoyo mutuo. Su presencia hizo de esta experiencia un camino más enriquecedor, colaborativo y humano.

Agradezco también a los **laboratorios de docencia de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica**, por facilitar espacios, equipos para la realización de los ensayos experimentales.

A todas las personas que, desde diferentes funciones, contribuyeron a hacer posible esta investigación, mi más sincero agradecimiento.

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

PhD Mauricio Redondo Solano
**Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado**

PhD Carlos Rodríguez Rodríguez
Director de Tesis

PhD Víctor Castro Gutiérrez
Asesor

MSc Michael Méndez Rivera
Asesor

PhD Gabriel Vargas Asensio
**Representante
Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología, Química Clínica e
Inmunología**

Gabriel Esteban Rodríguez Castillo
Sustentante

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
TABLA DE CONTENIDO	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1. Insecticidas neonicotinoides.....	2
1.1.1. Generalidades y principios activos	2
1.1.2. Neonicotinoides en el ambiente.....	3
1.1.3. Toxicología de neonicotinoides.....	6
1.2. Degradación microbiana de plaguicidas	8
1.2.1. Degradación microbiana del imidacloprid	9
1.2.2. Degradación microbiana del acetamiprid	11
1.2.3. Degradación microbiana de tiametoxan	12
1.3. Sistemas de biodegradación de plaguicidas.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. HIPÓTESIS	16
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
CAPITULO II. METOLOGÍA.....	17

6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1.	Identificación de los microorganismos del consorcio microbiano	17
6.2.	Capacidad degradativa de los consorcios aislados	18
6.3.	Eliminación de neonicotinoides a escala reactor.....	19
6.4.	Cuantificación de plaguicidas.....	20
6.5.	Ensayos ecotoxicológicos durante la eliminación en biorreactores	21
6.5.1.	Ensayo de germinación de semillas.....	21
6.5.2.	Test oral agudo en abejas melíferas.....	22
6.5.3.	Ensayo de <i>inhibición de la bioluminiscencia de Aliivibrio fischeri</i>	22
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN		23
7.	RESULTADOS	23
7.1.	Identificación de los microorganismos de los consorcios microbianos	23
7.2.	Capacidad degradativa de los consorcios aislados	25
7.3.	Eliminación de neonicotinoides a escala reactor.....	26
7.4.	Ensayos ecotoxicológicos durante la eliminación en biorreactores	28
8.	DISCUSIÓN.....	31
8.1.	Identificación de los microorganismos del consorcio microbiano	31
8.2.	Capacidad degradativa de los consorcios aislados	34
8.3.	Eliminación de neonicotinoides a escala reactor.....	35
8.4.	Variaciones ecotoxicológicas durante la eliminación en biorreactores.....	38
CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		41
9.	CONCLUSIONES.....	41
10.	RECOMENDACIONES	42
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMEN

El uso de plaguicidas en la agricultura es una práctica ampliamente extendida a nivel mundial; sin embargo, su manejo inadecuado puede provocar la contaminación de aguas superficiales, subterráneas y suelos. Entre los insecticidas más empleados destacan los neonicotinoides, utilizados en una gran variedad de cultivos por su alta selectividad hacia insectos. Sus propiedades fisicoquímicas, como la elevada solubilidad en agua y su prolongada vida media en el suelo, favorecen su persistencia y movilidad en los ecosistemas agrícolas, facilitando su transporte por escorrentía y lixiviación. Con el propósito de mitigar este impacto, se desarrolló y evaluó un sistema en fase líquida basado en un consorcio microbiano capaz de degradar simultáneamente y de forma cruzada distintos neonicotinoides. Se aislaron previamente dos consorcios microbianos a partir de suelos expuestos a estos compuestos, los cuales fueron identificados mediante la amplificación y secuenciación de los fragmentos ADNr 16S e ITS2. La eficiencia de degradación se evaluó en ensayos a escala de matraz, donde el consorcio N2 alcanzó una eliminación superior al 90% de imidacloprid y evidenció capacidad de degradación cruzada de imidacloprid, acetamiprid y tiametoxan. Posteriormente, el sistema fue escalado a un biorreactor de tanque agitado, en el cual el monitoreo químico mediante LC-MS/MS mostró una reducción significativa en las concentraciones de plaguicidas, acompañada de una disminución de la ecotoxicidad evaluada mediante bioensayos con *Apis mellifera*, *Aliivibrio fischeri* y *Lactuca sativa*. En conjunto, los resultados confirman que el sistema propuesto constituye una alternativa biotecnológica viable para la eliminación de neonicotinoides en aguas residuales agrícolas. Asimismo, la capacidad de degradación cruzada y el comportamiento estable durante el escalamiento sugieren que este enfoque podría aplicarse a la biorremediación de otros plaguicidas persistentes. Este trabajo representa un avance en el desarrollo de tecnologías sostenibles para la gestión de contaminantes agrícolas, con potencial de implementación en sistemas de tratamiento integrados a nivel de finca o planta piloto.

ABSTRACT

The use of pesticides in agriculture is a widespread practice worldwide; however, their improper management can lead to the contamination of surface water, groundwater, and soil. Among the most used insecticides are neonicotinoids, applied to a wide range of crops due to their high selectivity toward insect pests. Their physicochemical properties, such as high-water solubility and long soil half-life, promote persistence and mobility within agricultural ecosystems, facilitating their transport through runoff and leaching. To mitigate this impact, a liquid-phase system based on a microbial consortium capable of simultaneously and cross-degrading different neonicotinoids was developed and evaluated. Two microbial consortia were previously isolated from soils exposed to these compounds and identified through amplification and sequencing of the 16S rDNA and ITS2 regions. Degradation efficiency was assessed in flask-scale experiments, where consortium N2 achieved over 90% removal of imidacloprid and exhibited cross-degradation capability for imidacloprid, acetamiprid, and thiamethoxam. The system was subsequently scaled up to a stirred-tank bioreactor, in which chemical monitoring by LC-MS/MS revealed a significant reduction in pesticide concentrations, accompanied by a decrease in ecotoxicity as determined through bioassays with *Apis mellifera*, *Aliivibrio fischeri*, and *Lactuca sativa*. Overall, the results confirm that the proposed system represents a viable biotechnological alternative for the removal of neonicotinoids from agricultural wastewater. Furthermore, its cross-degradation capacity and stable performance during scale-up suggest that this approach could be applied to the bioremediation of other persistent pesticides. This study represents an advance in the development of sustainable technologies for agricultural contaminant management, with potential applications in integrated treatment systems at farm or pilot-plant scale.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades químicas y ambientales de insecticidas neonicotinoides	4
Cuadro 2. Parámetros analíticos del método LC-MS/MS para la cuantificación de neonicotinoides y productos de transformación	21
Cuadro 3. Descripción morfológica de los aislamientos microbianos.....	23
Cuadro 4. Aislamientos de los consorcios degradadores de imidacloprid, identificadas a partir de las secuencias ARNr 16S o ITS2 en la base de datos GenBank.	24
Cuadro 5. Concentración residual de neonicotinoides en ensayos de eliminación en fase líquida con diferentes consorcios bacterianos.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia bayesiana de aislamientos bacterianos del consorcio degradador de imidacloprid.....	25
Figura 2. Perfiles de eliminación durante el tratamiento simultáneo de imidacloprid y tiametoxan por el consorcio microbiano N1 en un reactor en discontinuo.	27
Figura 3. Perfiles de eliminación durante el tratamiento simultáneo de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid por el consorcio microbiano N1 en un reactor en discontinuo. ..	28
Figura 4. Variación del porcentaje del índice de germinación de <i>Lactuca sativa</i> como indicador de ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides, durante su tratamiento en un reactor discontinuo con un consorcio microbiano. Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en la toxicidad ($p < 0,05$).	29
Figura 5. Variación de la ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides durante su tratamiento en un reactor por lotes (STBR) con un consorcio microbiano, evaluada mediante inhibición de la bioluminiscencia de <i>A. fischeri</i> y expresada como concentración efectiva media (CE_{50}). Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises).	30
Figura 6. Variación de la ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides durante su tratamiento en un reactor por lotes (STBR) con un consorcio microbiano, evaluada mediante el ensayo de toxicidad oral aguda en abejas melíferas <i>Apis mellifera</i> y expresada como dosis letal media (DL_{50}). Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises).	31

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr 16S	Ácido desoxirribonucleico ribosomal 16S
ANOVA	Análisis de varianza
BH-N	Bushnell-Haas sin nitrógeno
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CN	Código de aislamiento del consorcio
CP	Número de acceso en GenBank
CTS	Caldo Trypticase y Soya
DL ₅₀	Dosis letal media
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
IG	Índice de germinación
ISO	Organización Internacional de Normalización
ITS2	Espaciador interno transcrito 2 (para identificación de hongos)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
n	Número de repeticiones
N1 / N2	Consortios microbianos aislados
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
STBR	Biorreactor de tanque agitado operado en discontinuo
UFC	Unidades formadoras de colonias
USEPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
6-CNA	Ácido 6-cloronicotínico

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son de los compuestos químicos más empleados en todo el mundo, según la FAO, en el 2023 se utilizaron en la agricultura 3,73 millones de toneladas a nivel mundial (FAO, 2025). Se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que alteren los procesos biológicos de los organismos que se consideren plagas. Son ampliamente utilizados para reducir al mínimo las infestaciones en los cultivos y, por lo tanto, evitar las pérdidas de rendimiento y la reducción de la calidad del producto (Damalas, 2009). Estas plagas causan daño o interfieren en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos y productos agrícolas (FAO, 2002).

La aplicación de plaguicidas puede causar efectos adversos entre las diferentes formas de vida y entre los ecosistemas; esto dependerá del grado de sensibilidad de los organismos y el compuesto (CICOPLAFEST, 2004). El uso de plaguicidas ha aumentado de forma constante en las últimas décadas, lo que ha provocado la acumulación de ingredientes activos residuales en el medio ambiente (Cruzeiro et al., 2018). Se han detectado de forma rutinaria en el aire, aguas superficiales y subterráneas, sedimentos, suelo, plantas y en los alimentos. La acumulación de sus residuos y metabolitos actualmente ha alcanzado niveles altos (Gamón et al., 2003; Shalaby & Abdou, 2010).

La presencia de plaguicidas en el ambiente es consecuencia directa de inadecuadas prácticas agrícolas que generan contaminación tanto puntual como difusa. La contaminación puntual se refiere a la liberación de contaminantes desde fuentes identificables y localizadas, en contraste con la contaminación difusa, que proviene de fuentes dispersas como escorrentías agrícolas, lixiviación del suelo y deriva de pulverización (Wang et al., 2019; Castillo et al., 2008). En el ámbito agrícola, las principales fuentes de contaminación puntual incluyen un mal manejo de los plaguicidas durante el llenado y la limpieza de los equipos de fumigación, así como la eliminación de los residuos después de su aplicación en el campo (Mussali-Galante et al., 2023). Para maximizar los beneficios y minimizar los riesgos se debe invertir tiempo, dinero y esfuerzo en el desarrollo de productos y prácticas de seguridad, con el fin de mejorar la producción sostenible, la calidad del medio ambiente y la salud humana (Damalas, 2009).

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Insecticidas neonicotinoides

1.1.1. Generalidades y principios activos

Los neonicotinoides pertenecen al grupo de los insecticidas sistémicos de nitroguanidina derivados de la nicotina (Jeschke et al., 2010). Son utilizados para controlar las plagas de insectos en una variedad de entornos agrícolas, comerciales, residenciales y veterinarios (Goulson, 2013). Al inicio de la temporada de siembra son aplicados a los cultivos como forma de tratamiento a suelos, semillas y para proteger las raíces de las plántulas y en la temporada tardía se utilizan en tratamientos foliares (Jeschke & Nauen, 2008). Los neonicotinoides han sido utilizados con éxito, en parte debido a la baja toxicidad aguda para los mamíferos y la alta toxicidad para la mayoría de las plagas de insectos (Tennekes, 2011).

Estos insecticidas fueron desarrollados y registrados por primera vez en 1991 con el lanzamiento del precursor imidacloprid, por parte de Bayer CropScience, que ha sido el insecticida más vendido del mundo durante muchos años (Nauen et al., 2018). Esto como respuesta a la resistencia de las plagas y la exposición acumulada de los insecticidas organofosforados y carbamatos (Eskenazi et al., 1999). Los neonicotinoides están registrados en más de 120 países y se encuentran entre los insecticidas más eficaces para el control de plagas de insectos chupadores, como pulgones, moscas blancas, trips, algunos microlepidópteros y varias plagas de coleópteros (Jeschke et al., 2010).

El éxito sin precedentes de los insecticidas neonicotinoides se refleja en sus cifras de facturación. En 1990, antes del lanzamiento del primer insecticida neonicotinoide, el mercado de productos agroquímicos estaba dominado por los organofosforados (43%), los piretroides (18%) y los carbamatos (16%) (Jeschke et al., 2010). Actualmente, se estima que los neonicotinoides ocupan alrededor del 25 % del mercado global de insecticidas, superando en presencia a grupos tradicionales como los carbamatos u organofosforados (Borsuah et al., 2020; Cui et al., 2024). Según el Servicio Fitosanitario del Estado, hay registrados y activos en Costa Rica 57 productos comerciales fabricados con algún neonicotinoide, aprobados para más de 20 cultivos agrícolas (SFE, 2025). El imidacloprid se encuentra entre los 21 plaguicidas

de mayor uso en el país (79,3%) en el 2022, representando un uso aparente de 18.959 kg de ingrediente activo por año (Vargas et al., 2022).

Los neonicotinoides se pueden dividir en tres clases principales: compuestos de cloropiridinilo (imidacloprid, nitenpiran, acetamiprid, tiacloprid), compuestos de clorotiazolilo (tiametoxan, clotianidina) y compuestos de tetrahidrofurilo (dinotefuran) (Sheets et al., 2016). Estos plaguicidas se usan a nivel mundial predominantemente en colza, girasol, cereales, remolacha y papa (Jeschke et al., 2010). En Costa Rica están autorizados para su uso principalmente en piña, tomate, algodón, arroz, caña de azúcar, melón, sandía, naranja y ornamentales (SFE, 2025). Se aplican comúnmente como aerosoles foliares en hortalizas, frutos blandos y flores, además se utilizan en formulaciones para uso doméstico contra cucarachas y hormigas. Pueden inyectarse en la madera para combatir las termitas o en los árboles para protegerlos contra los herbívoros (Oliver et al. 2010).

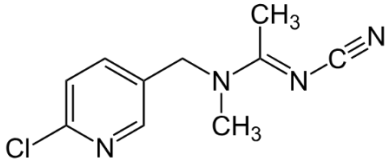
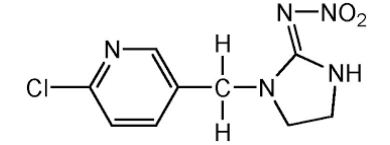
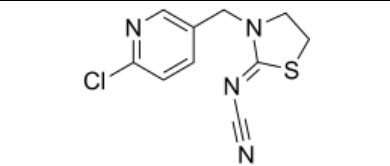
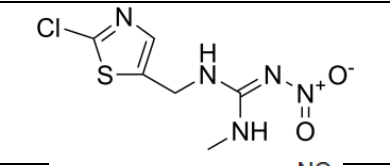
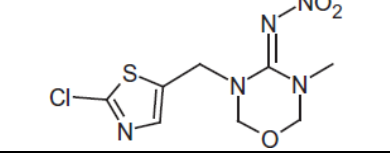
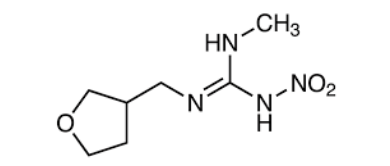
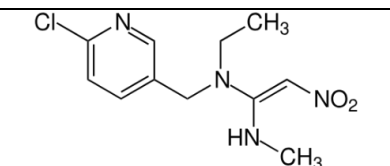
La acción insecticida de estos plaguicidas se atribuye a la activación de los receptores nicotínicos postsinápticos de acetilcolina (nAChR) en el sistema nervioso central de invertebrados, por lo que compiten con el neurotransmisor natural acetilcolina (ACh). La molécula del insecticida se une a la nAChR en los insectos, sosteniendo el canal abierto y causando estimulación del sistema nervioso de forma continua (Sheets et al., 2016). Estudios de toxicidad en los artrópodos sugieren que la unión a estos receptores es de larga duración y los efectos letales suelen retrasarse de tal forma que una exposición repetida o crónica puede dar lugar a efectos acumulativos en el tiempo (Tennekes, 2011; Tennekes & Sanchez-Bayo, 2013). Muchos invertebrados como los del orden Ephemeroptera y Tichoptera son extremadamente sensibles a estos compuestos, incluyendo las especies acuáticas no diana y los polinizadores terrestres como los abejorros y las abejas melíferas (Roessink et al., 2013).

1.1.2. Neonicotinoides en el ambiente

Los neonicotinoides tienen una alta solubilidad en agua, lo que promueve la circulación de estos insecticidas a través de la superficie y del subsuelo, generando persistencia prolongada en condiciones ambientales (Cuadro 1) (Tisler et al., 2009). Las principales rutas de transporte para los ecosistemas acuáticos incluyen la escorrentía superficial después de los eventos de lluvia, la lixiviación en las aguas subterráneas asociado a la descarga del subsuelo,

la deposición de las semillas tratadas, dispersión del rociado en cuerpos de agua, además del mal manejo de los residuos líquidos, posterior a la aplicación (Chiovarou & Siewicki, 2008; Lamers et al., 2011).

Cuadro 1. Propiedades químicas y ambientales de insecticidas neonicotinoides

Nombre común del insecticida	Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	Fotólisis acuosa pH 7 (DT ₅₀ en días)	Hidrólisis en agua a 25°C pH 7 (DT ₅₀ en días)	Persistencia en el suelo (DT ₅₀ en días) en laboratorio	Estructura química
Acetamiprid	2950 (Alta)	34 (Estable)	Moderadamente Estable; 420 días	31-450	
Imidacloprid	610 (Alta)	0,2 (Rápida)	Estable; 182 días	200-1000	
Tiacloprid	184 (Moderada)	10-63 (Estable)	Ligeramente inestable	3-74	
Clotianidina	340 (Moderada)	<1 (Rápida)	Muy Estable; >4000	148-1150	
Tiametoxan	4100 (Alta)	2,7 (Moderadamente rápida)	Estable; >800 días	7-353	
Dinotefuran	39830 (Alta)	0,2 (Rápida)	No estable	4-150	
Nitenpiran	590000 (Alta)	ND	Estable	1-15	

ND: No hay Datos

Fuente: Adaptado de Lewis et al., 2016.

La persistencia en el suelo y la descarga de los neonicotinoides en cuerpos de agua depende en gran medida de factores como la tasa de aplicación, el pH, la temperatura, la presencia o ausencia de cultivo o cubierta vegetal, la rotación de cultivos, el tipo de suelo y el contenido orgánico, además del uso de fertilizantes. Estudios de disipación de campo donde se aplicó el imidacloprid en plantaciones de maíz, tomate y césped, reportaron una vida media en el suelo de 7, 53 y 61-107 días respectivamente (SERA, 2005). Otros estudios indican, para los tratamientos de semillas, vidas medias en el suelo que varían de 200 a más de 1000 días para imidacloprid y tiametoxan (Goulson, 2013). Scholz & Spiteller (1992) encontraron que el tiempo de disipación del imidacloprid fue más rápido en suelos con cultivos de cobertura (48 días) que en los suelos desnudos (190 días). Adicionalmente, estudios han demostrado que aumentos en el carbono orgánico en el suelo y el uso de fertilizantes, disminuyen la adsorción del suelo y aumentan aún más la movilidad y la lixiviación de imidacloprid debido a la competencia entre el plaguicida y la materia orgánica (Flores- Céspedes et al., 2002).

Las características que influyen en la retención del suelo y la persistencia también afectan la lixiviación de los neonicotinoides en las aguas subterráneas. En ausencia de luz, los neonicotinoides pueden persistir en el suelo y ser transportados vertical u horizontalmente en las aguas subterráneas (Gupta et al., 2008). En consecuencia, varios estudios han detectado neonicotinoides en las aguas subterráneas a concentraciones máximas que van de $1,93 \mu\text{g L}^{-1}$ (imidacloprid) a $8,93 \mu\text{g L}^{-1}$ (tiametoxan) (Morrissey et al, 2015).

Estudios de campo sobre el destino del imidacloprid aplicado en arrozales en tasas mayores a 10.000 g ha^{-1} , encontraron que las concentraciones en agua alcanzaron su punto máximo de $30,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Thuyet et al., 2011). Starner & Goh (2012) detectaron imidacloprid en el 89% de las muestras de agua tomadas de ríos, arroyos y desagües en California, y el 19% de las muestras excedieron la concentración de $1,05 \mu\text{g L}^{-1}$ permitidas por la Agencia de Protección Ambiental de EEUU. En los Países Bajos, se han informado concentraciones de hasta $200 \mu\text{g L}^{-1}$ en aguas subterráneas y arroyos (van Dijk, 2010). Las concentraciones medibles y toxicológicamente relevantes de imidacloprid pueden todavía ser detectados hasta un año después de su aplicación (Kanrar et al., 2006).

Los neonicotinoides son fácilmente absorbidos por las plantas a través de sus raíces u hojas y luego son transportados a través de los tejidos de la planta (Byrne & Toscano, 2006).

Cuando se aplican como tratamiento para las semillas, las concentraciones en el néctar varían de <1 a $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$, con concentraciones en polen que van desde <1 a $51 \mu\text{g L}^{-1}$ (EFSA, 2012). Cuando los neonicotinoides se aplican directamente al suelo, las concentraciones varían de 1 a $23 \mu\text{g L}^{-1}$ en néctar y de 9 a $66 \mu\text{g L}^{-1}$ en polen (USEPA, 2012). Sin embargo, las concentraciones más altas registradas en néctar y polen parecen ser el resultado de aplicaciones foliares; Dively & Kamel (2012) informan que las concentraciones de tiametoxan en néctar varían de 6 a $9 \mu\text{g L}^{-1}$, y en polen varían de 61 a $127 \mu\text{g L}^{-1}$ y cuando se aplican en aerosol en el cultivo de calabaza.

1.1.3. Toxicología de neonicotinoides

La toxicidad aguda de los neonicotinoides para los mamíferos, peces y aves generalmente se informa como inferior a la de muchos otros insecticidas, sin embargo, las concentraciones extremadamente bajas parecen ejercer toxicidad en una amplia gama de artrópodos, especialmente insectos y algunos crustáceos (Mineau & Palmer, 2013). En los mamíferos y otros vertebrados, la menor afinidad de los neonicotinoides a sus receptores nicotínicos postsinápticos de acetilcolina (nAChR) parece estar relacionada con la diferente configuración de las subunidades que componen este receptor, por lo que la unión del insecticida es débil (Yamamoto et al., 1995). Las diferencias en la hidrofobicidad de los compuestos pueden también afectar la absorción (penetración a través de la cutícula y la membrana) y la actividad insecticida (Yamamoto et al., 1998).

Los neonicotinoides son conocidos por tener una aditiva o sinérgica toxicidad cuando se aplican juntos, o en combinación con ciertos fungicidas que son potentes inhibidores de la enzima citocromo P450 monooxigenasa (Iwasa et al., 2004). Por ejemplo, la combinación de clotianidina y el fungicida trifloxistrobina (usados en la formulación del tratamiento de semillas de canola) resultó en un aumento de 150 veces en la tasa de muertes de las larvas del escarabajo de la hoja (*Phaedon* sp.) en comparación con la clotianidina sola (Wachendorff-Neumann et al., 2012). Bayer Crop Science ha patentado varias combinaciones de dos neonicotinoides que demuestran actividad insecticida sinérgica. Los tratamientos individuales con $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de tiacloprid o $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ de clotianidina afectan al 25% y 0% de las poblaciones de áfidos después de 6 días respectivamente, pero combinadas a las mismas dosis, la tasa de muertes aumentó a 98%. Los neonicotinoides también pueden

interactuar sinérgicamente con otros plaguicidas u otros ingredientes de formulación inertes comúnmente presentes en los sistemas acuáticos en las zonas agrícolas (Zhang et al., 2016).

Los neonicotinoides pueden ejercer efectos letales y subletales significativos en poblaciones de invertebrados acuáticos. La toxicidad general, aguda y crónica de los neonicotinoides varía mucho entre los artrópodos (los valores de la Dosis Letal Media (DL_{50}) oscilan entre <1 a $>1000 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Beketov & Liess, 2008; Jemec et al., 2007; Ashauer et al., 2011). *Daphnia magna* ha sido ampliamente estudiada en pruebas de toxicidad, sin embargo, Ashauer et al., (2011) informaron que esta especie es menos sensible para estudios toxicológicos en neonicotinoides, tanto agudos como crónicos. En comparación, Roessink et al., (2013) examinaron la toxicidad aguda y crónica de imidacloprid en una amplia gama de insectos acuáticos y otros crustáceos y encontraron que las efímeras (Ephemeroptera) y moscas Caddis (Trichoptera) fueron los grupos más sensibles en ambos ensayos de toxicidad aguda y crónica, con valores de Concentración Letal Media (CL_{50}) y Concentración Efectiva Media (CE_{50}) en el rango de 0,1 hasta $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$; otros estudios han demostrado que mosquitos (Chironomidae) y algunos otros Díptera también pueden tener sensibilidad similar.

Crosby y colaboradores (2015) examinaron el imidacloprid para los efectos neuroconductuales de desarrollo en el pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo. Las larvas del pez cebra fueron expuestas a través de la inmersión en soluciones acuosas que contenían 45 o 60 mM de imidacloprid o nicotina, a partir de 4 horas a 5 días post-fertilización. Los exámenes neuroconductuales se llevaron a cabo el día 6 después de la fecundación (larvas), en individuos jóvenes y adultos. Las pruebas incluyeron medidas de la respuesta sensomotora, modelos de nado en el tanque, comportamiento de los bancos de arena, entre otros. Tanto el imidacloprid y como la nicotina disminuyeron la actividad de las larvas, además identificaron cambios neuroconductuales persistentes y disminución de la capacidad de exploración en jóvenes y adultos de este pez.

Los neonicotinoides han causado controversia en los últimos años debido a su alta toxicidad para los polinizadores y se sospecha que han contribuido de manera significativa a la disminución global de estas poblaciones de insectos, que son esenciales para la producción de alimentos (Jeschke et al., 2010). Debido a su acción sistémica, pueden llegar a los recursos alimentarios de abejas como el polen y el néctar de los cultivos tratados. La resiliencia se

demostró en condiciones de campo, donde las abejas individuales cerca de los campos tratados con neonicotinoides desaparecieron a un ritmo más rápido (Dussaubat et al., 2016). Del 80-98% del ingrediente activo que no es absorbido por el cultivo, una pequeña proporción (<2%) se pierde como polvo durante la siembra. Este polvo aéreo puede ser suficiente para causar mortalidad directa en abejas voladoras cercanas (Tapparo et al., 2012).

Estudios realizados por Scholer & Krischik (2014) determinaron los efectos negativos del imidacloprid (de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) en colonias de abejas. El impacto más grande fue la reducción de la supervivencia de la reina, movimiento de los obreros, el consumo de colonia y el peso de las colonias en comparación con el control. Dussaubat y colaboradores (2016) estudiaron los efectos individuales y combinados de plaguicidas al exponer crónicamente a una dosis subletal ambiental de imidacloprid a las reinas en las colmenas de apareamiento durante tres meses. Ellos determinaron que el 50% de las reinas del grupo habían muerto a los 15 días después de su introducción en las colmenas. Aseguran además que debido a que la regulación demográfica de la colmena se basa en la fertilidad de la reina, el compromiso de su fisiología puede amenazar seriamente la supervivencia de la colmena bajo la presión de factores de estrés combinados.

Después de que investigaciones realizadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria identificaran preocupaciones con respecto al uso de neonicotinoides, la Comisión Europea (CE) ha llevado a una interrupción en el uso de tres neonicotinoides (clotianidina, tiametoxan e imidacloprid). Esta medida es vinculante en todos los estados miembros y entró en vigor a fines del 2018, fue aplicada a todo los cultivos y espacios públicos, excepto a aquellos dentro de invernaderos permanentes. Otros países están revisando el estado de registro y las pautas para el uso de insecticidas neonicotinoides (Declan, 2018).

1.2. Degradación microbiana de plaguicidas

Existen dos diferentes métodos de degradación de plaguicidas en el ambiente, que tienen que ver con los factores bióticos o abióticos involucrados. La degradación abiótica se debe a las transformaciones químicas y físicas del plaguicida, por procesos tales como la fotólisis, hidrólisis, oxidación, reducción y reordenamientos (Kumar et al., 2024; Sharma et al., 2016).

En la degradación biótica los plaguicidas deben estar biológicamente disponibles para que se lleve a cabo una transformación enzimática, que es el principal resultado de los procesos mediados por plantas y microorganismos (Kumar et al., 2024).

Los microorganismos pueden degradar plaguicidas a través del metabolismo relacionado a su crecimiento, lo cual implica que tienen la capacidad de proliferar durante la degradación, utilizando el plaguicida como fuente de carbono, nitrógeno o energía (Nzila, 2013; Stoyanova et al., 2023). También lo pueden hacer en condiciones cometabólicas, donde la biodegradación depende de la suplementación con fuentes adicionales de carbono y/o nitrógeno. En este caso el contaminante no es utilizado como fuente de energía, por lo que su biodegradación no constituye una ventaja para el microorganismo y es resultado de un evento fortuito (Kumar et al., 2024).

Investigadores han logrado aislar un número importante de bacterias con la capacidad de utilizar plaguicidas específicos como única fuente de energía (por ejemplo, cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Arthrobacter*) (Pathak et al., 2022; Ahmad et al., 2021). También se reportan comunidades mixtas o consorcios microbianos con mayor eficiencia de degradación que cepas aisladas (Lü et al., 2024). Dichos consorcios permiten complementar rutas metabólicas y catabolitos intermedios, mejorando la degradación global del plaguicida (Kumar et al., 2024).

La eficiencia de la biodegradación puede incrementarse tras un período de adaptación microbiana al contaminante, en el cual las comunidades del suelo experimentan cambios funcionales, inducen rutas metabólicas específicas y modifican su genética para tolerar y degradar los plaguicidas con mayor rapidez (Zhang et al., 2021., Li et al., 2023). Por ello, el suelo representa una fuente importante para aislar microorganismos con potencial degradador, especialmente en suelos agrícolas con historial de exposición, lo que implica una oportunidad real y práctica para su uso en el tratamiento de residuos de plaguicidas.

1.2.1. Degradación microbiana del imidacloprid

Uno de los sistemas más eficientes de degradación de imidacloprid es el reportado por Ma et al., (2014), donde por medio de *Pseudoxanthomonas indica* aislada del suelo rizosférico, se

logró degradar imidacloprid a una tasa de $2,17 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, por vía cometabólica, un desempeño considerado entre los más rápidos reportados. Sin embargo, las vías de degradación de imidacloprid varían considerablemente y varios de los metabolitos son más tóxicos y persistentes que el plaguicida original. Los metabolitos más ampliamente reportados de imidacloprid son olefina, 4-hidroxi-imidacloprid y 5-hidroxi-imidacloprid. De estos el imidacloprid olefina, es 10 veces más tóxico que imidacloprid para insectos y mamíferos (Ma et al., 2014; Pang et al., 2020).

La cepa PC-21 de *Leifsonia* sp., degradó en presencia de glucosa y succinato como fuentes suplementarias de carbono, 37% a 58% de imidacloprid después de tres semanas, dando lugar a metabolitos como guanidina y urea (Anhalt et al., 2007). De forma similar, la biotransformación de imidacloprid y tiametoxan por *Pseudomonas* sp. 1G en presencia de glucosa como fuente de carbono suplementaria, obtuvo una eficiencia de degradación del 70% en 14 días, e implicó la reducción del grupo N-nitroimino a nitrosoguanidina mediante actividad de aldehído oxidasa bajo condiciones microaerófilas (Pandey, Kumar & Dikshit, 2009). Recientemente se han identificado nuevas cepas con capacidad de degradación de imidacloprid en medios oligotróficos, como *Hymenobacter latericoloratus* CGMCC 16346, que en ausencia de cosustratos logró degradar cerca del 64% del imidacloprid dispuesto (Guo et al., 2020).

Phugare et al. (2013) estudiaron la degradación cometabólica de imidacloprid por la cepa BCH1 *Klebsiella pneumoniae* obteniendo 78% de degradación en 7 días, transformando el imidacloprid en ácido 6-cloronicotínico (6-CNA) a través de compuestos intermedios de nitrosoguanidina e imidacloprid guanidina. En un experimento con un consorcio de *Bacillus* sp., Sharma, Singh & Gupta (2014) alcanzaron una degradación del 93% en 54 días, con generación de metabolitos 6-CNA y nitrosoguanidina. En muchas rutas bacterianas propuestas, el 6-CNA surge como metabolito acumulado común. No obstante, algunas cepas como *Bradyrhizobiaceae* SG-6C han sido identificadas como bacterias quimiolitautotróficas capaces de mineralizar 6-CNA, lo que sugiere que es viable una ruta completa de mineralización del imidacloprid (Pearce et al., 2011).

1.2.2. Degradación microbiana del acetamiprid

La degradación microbiana del acetamiprid ha sido estudiada en diversos sistemas bacterianos, mostrados tanto en cultivos puros como en comunidades microbianas. En un estudio comparativo, Hussain et al., (2016) reportan que las cepas *Stenotrophomonas* sp. THZ-XP y *Pigmentiphaga* sp. AAP-1 transformaron acetamiprid más rápidamente que otros cultivos puros, logrando degradar 1 g L⁻¹ en 14 h y 100 mg L⁻¹ en 2,5 h, respectivamente.

En particular, la cepa *Pigmentiphaga* sp. AAP-1 fue capaz de utilizar 100 mg L⁻¹ de acetamiprid como única fuente de carbono y nitrógeno, aunque con bajas tasas de crecimiento, y se identificó un metabolito de N-desacetilación: 1-(6-cloro-3-piridil)-N-metilmetanamina (Wang et al., 2013b). La cepa *Pigmentiphaga* sp. D-2 también ha sido objeto de estudio, y se propuso una ruta de degradación parcial mediante tres metabolitos identificados: N'-[(6-cloropiridin-3-il) metil]-N-metilacetamida, N'-ciano-N-metil-N-(piridin-3-ilmetil) etanimidamida, y ACE-VI (Yang et al., 2013).

Phugare & Jadhav (2015) investigaron el cometabolismo de acetamiprid por *Rhodococcus* sp. BCH2 en presencia de glucosa y cloruro de amonio, detectando metabolitos como N-metil (6-cloro-3-piridil) metilamina (ACE-VI) y 6-CNA. Por su parte, Wang et al. (2013c) propusieron una ruta cometabólica para *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7, en la cual el acetamiprid (100 mg L⁻¹) se hidrolizó a ACE-VI en 60 h. En otro estudio, *Ochrobactrum* sp. D-12 fue capaz de degradar 300 mg L⁻¹ de acetamiprid como fuente de carbono y energía hasta niveles no detectables en 48 h (Wang et al., 2013a).

Las enzimas hidratasa tipo nitrilo (NHasa) se han encontrado en diversos microorganismos, incluyendo *Pseudaminobacter salicylatoxidans* y *Variovorax boronicumulans*, contribuyendo a la hidratación del nitrilo de acetamiprid a amidas intermedias (Randhawa et al., 2024). Estudios han demostrado que la enzima NHasa de *Ensifer meliloti* CGMCC 7333 fue capaz de biotransformar acetamiprid a un metabolito intermedio de amida, el cual luego se degradó a ACE-VI (Zhou et al., 2014b). Elango et al. (2023), determinaron que NHasa de la cepa *Brucella intermedia* PDB13, fue identificada como responsable de la conversión del 89,72% de acetamiprid en el metabolito IM-1-2.

Además, consorcios microbianos enriquecidos han demostrado tener la capacidad de degradar completamente acetamiprid. Por ejemplo, el consorcio ACE-3 (dominado por betaproteobacterias) enriquecido con suelo contaminado, degradó totalmente 50 mg·L⁻¹ de este plaguicida en 144 h (Xu et al., 2020). La revisión más reciente de Sun et al. (2024) resume los mecanismos microbianos de degradación de acetamiprid, señalando rutas de N-desmetilación, ruptura oxidativa del grupo cianoimino y formación de compuestos amídicos como vías comunes (Sun et al., 2024).

1.2.3. Degradación microbiana de tiametoxan

Diversos estudios han demostrado que ciertas cepas bacterianas poseen la capacidad de degradar tiametoxan, un insecticida neonicotinoide ampliamente utilizado. Pandey et al. (2009) informaron que la cepa de *Pseudomonas* sp. 1G reportada como degradadora de imidacloprid, también puede transformar el tiametoxan para producir los mismos metabolitos del grupo N-nitroimino (=N-NO₂) como se describió anteriormente para imidacloprid. En cultivos puros de *Pseudomonas* sp. 1G, bajo condiciones aeróbicas y suplementación con glucosa, el grupo N-nitroimino de tiametoxan se transformó en nitrosoguanidina, desnitro/guanidina y metabolitos de urea. De manera consistente, Zhou et al. (2013) confirmaron que la vía metabólica principal de tiametoxan en *Ensifer adhaerens* involucra la transformación de su grupo N-nitroimino a N-nitrosimina/nitrosoguanidina (=N-NO, desnitro/guanidina) y urea.

Diversos estudios han explorado el papel de los consorcios microbianos en la biodegradación de neonicotinoides, demostrando que estas bacterias pueden desempeñar un papel clave en la degradación rápida *in situ* de los plaguicidas en el suelo. Por ejemplo, Zhou et al. (2014a) aislaron un cultivo bacteriano enriquecido a partir de suelo que logró degradar el 96 % de 200 mg L⁻¹ de tiametoxan en 30 días, mediante la vía de reducción del grupo nitro. Se ha demostrado también que bacterias como *Bacillus cereus*, aisladas de lodos activados, pueden degradar tiametoxan en un rango de 41,0 % a 68,9 % mediante la reducción del grupo nitro y la escisión del ciclo de oxadiazina, generando metabolitos como hidroxilo-clotianidina-tri (Xiang et al., 2024).

Estudios más recientes han identificado nuevos microorganismos capaces de degradar

eficientemente tiametoxan. Satheeshkumar et al. (2025) aislaron cepas bacterianas como *Stutzerimonas* sp. SA1 y *Pseudomonas* sp. SA3, capaces de degradar neonicotinoides, incluyendo tiametoxan, mediante la reducción del grupo nitro. Adicionalmente, estudios en suelos agrícolas y huertos de mango han aislado cepas bacterianas capaces de degradar tiametoxan, evaluando la localización de las enzimas degradadoras en fracciones citosólicas y de membrana celular, lo que evidencia el potencial de estos microorganismos para la biorremediación de suelos contaminados por neonicotinoides (Shukla et al., 2025). Estos hallazgos destacan la importancia de los consorcios microbianos y la diversidad metabólica en la eficiencia de la degradación microbiana de neonicotinoides en ambientes naturales.

1.3. Sistemas de biodegradación de plaguicidas

Para reducir el efecto de la contaminación por plaguicidas han sido implementados diferentes sistemas fisicoquímicos y biológicos, sin embargo, muchos de ellos son costosos o requieren alta tecnología para ser aplicados, por lo que no pueden ser utilizados en las fincas productoras. Debido a estas limitaciones se ha orientado la investigación al diseño de sistemas más simples denominados colectivamente Sistemas de Biopurificación de Plaguicidas (SBP), que aprovechan y potencian la eficiencia degradativa de los microorganismos, además de la capacidad de adsorción de sus componentes para limitar el impacto que puedan causar en el ambiente (Rodríguez-Rodríguez et al., 2013).

Estos sistemas contienen una matriz biológicamente activa denominada biomezcla, que se encuentra alojada en una excavación o recipiente cerrado donde se vierten las aguas de descarte de los plaguicidas. La degradación efectiva de los mismos se debe a la actividad metabólica aumentada de microorganismos que se encuentran en esta mezcla, además de la capacidad que tengan los materiales de retener altas cargas de plaguicidas. Los componentes de la matriz que permiten este proceso son: suelo pre-expuesto a plaguicidas, un sustrato orgánico de alto contenido húmico y materiales lignocelulósicos mezclados en diferentes proporciones (Castillo, Torstensson & Stenström, 2008).

En el caso de los neonicotinoides, los escasos informes describen su eliminación en SBP, generalmente con resultados inviables debido a los elevados tiempos de degradación, en parte explicado por la baja adaptación microbiana en suelos sin preexposición. Díaz et al., (2017)

determinó la capacidad de biodegradación del imidacloprid obteniendo en el suelo suplementado con vermicompost tiempos de degradación de 67 y 265 días (DT_{50} y DT_{90} respectivamente). De manera similar, Huete-Soto et al., (2017) determinaron la capacidad de eliminación de varios plaguicidas en una biomezcla, compuesta por un suelo sin preexponer, durante 115 días y observaron que imidacloprid y tiametoxan no se eliminaron significativamente en la biomezclas. Por otra parte, Rodríguez-Castillo et al., (2018) determinaron en dos biomezclas diferentes (producidas con suelo preexpuerto a imidacloprid), que después de 228 días de tratamiento la eliminación osciló entre 22,3% y 30,3%, 38,6% y 43,7% para imidacloprid y tiametoxan, respectivamente, con vidas medias de mineralización estimadas en 150-170 días para imidacloprid y 120-140 días para tiametoxan.

En respuesta a la necesidad de biodegradar residuos de plaguicidas persistentes, se han desarrollado también sistemas de fase líquida como reactores de lecho móvil, con alta efectividad en el tratamiento biológico de contaminantes industriales. Este sistema presenta ventajas frente a aquellos de fase sólida pues mezcla completamente los componentes aumentando la capacidad de intercambio. Pueden ser de funcionamiento continuo, donde la biomasa se cultiva en elementos de soporte pequeños que se mueven a lo largo del reactor con el flujo de entrada y salida líquido, aumentando el volumen de contaminantes a degradar en un tiempo determinado (Shim & Kawamoto, 2002; Chen, Sun & Chung, 2007). Castro-Gutiérrez y colaboradores (2016) optimizaron un sistema de degradación de carbofurán con una alta eficiencia en un reactor de tanque agitado operado de forma continua utilizando consorcios bacterianos. Este sistema logró condiciones de eliminación completa de hasta 100 mg L⁻¹ a un tiempo de retención hidráulico (HRT) de 23 h.

Con el fin de utilizar un sistema líquido como estrategia de degradación de neonicotinoides, previo a esta investigación, se realizó un aislamiento de consorcios microbianos a partir de un suelo agropecuario expuesto con anterioridad a imidacloprid de la finca Santa Marta ubicada en San Mateo de Alajuela. Esto se llevó a cabo por medio de un enriquecimiento selectivo de 5 g de muestra del suelo en 100 mL de medio de cultivo líquido de sales minerales, Bushnell Haas (BH) (Bushnell & Haas, 1941) enriquecido con imidacloprid (50 mg L⁻¹) a tres diferentes condiciones: medio de cultivo sin fuente de carbono, medio de

cultivo sin fuente de nitrógeno, pero con adición de glucosa y medio de cultivo sin fuentes de carbono ni nitrógeno. Posteriormente mediante un ensayo de degradación se seleccionaron dos consorcios con capacidad degradativa (ambos provenientes del medio BH limitado en nitrógeno y enriquecido con glucosa).

2. JUSTIFICACIÓN

La inadecuada manipulación de los plaguicidas puede dar lugar a la presencia de residuos contaminantes en aguas superficiales, subterráneas y suelo, generando graves problemas ambientales. Las principales actividades agrícolas que presentan mayor riesgo de generar contaminación en esta matriz son el vertido de los concentrados de los contenedores de aspersión y el mal manejo de los residuos de plaguicidas retenidos en el tanque de aplicación (Castillo, Torstensson & Stenström, 2008). El uso de Sistemas de Biopurificación ha sido implementado en otros países como una solución sencilla y de bajo costo que limita el riesgo de contaminación de aguas con plaguicidas, sin embargo, no han sido eficientes para plaguicidas persistentes como los neonicotinoides.

Según el Servicio Fitosanitario del Estado los neonicotinoides son comúnmente utilizados en cultivos como tomate, algodón, chile dulce, banano, papa, melón, cítricos, sandía, entre otros. Sus características de alta solubilidad en agua y su persistencia en el suelo y el agua, generan persistencia prolongada en condiciones ambientales (Tisler et al., 2009). Esto aunado a la alta toxicidad para los organismos no objetivo, ha orientado a esta investigación de tesis al diseño de un sistema de degradación que permita tratar adecuadamente los residuos de estos compuestos. La utilización de suelos expuestos con anterioridad a plaguicidas como fuente de microorganismos degradadores, constituye el paso inicial para el establecimiento de sistemas de degradación biológica y es el punto de partida de esta investigación.

Si bien es cierto ya se han establecido con éxito sistemas de degradación para plaguicidas, estos deben ser adaptados a las condiciones de cada región, a las necesidades de los productores y a las características propias de los compuestos, ya que no son sistemas eficientes para todas las moléculas. Las configuraciones y los diseños deben ir orientados a tener una máxima eficiencia en la degradación, en el menor tiempo posible, sin embargo, en el caso de los neonicotinoides estos sistemas no han logrado degradarlos eficientemente.

Por ello, es necesario explorar otras alternativas como el uso de biorreactores donde se estimule la actividad depuradora de los microorganismos. El uso de técnicas moleculares tiene el potencial de incrementar sustancialmente el conocimiento de los procesos microbiológicos involucrados en la disipación de plaguicidas en estos sistemas y facilitar su adecuada modificación hacia un óptimo rendimiento de biodepuración.

3. HIPÓTESIS

Un consorcio microbiano aislado de un suelo agropecuario expuesto con anterioridad a imidacloprid, puede mediante un sistema de fase líquida degradar simultáneamente imidacloprid y otros neonicotinoides.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de un sistema en fase líquida para que sea capaz de degradar simultáneamente imidacloprid y otros insecticidas del grupo de los neonicotinoides, por medio de un consorcio microbiano aislado previamente de un suelo agropecuario expuesto a imidacloprid.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 5.1 Identificar los microorganismos que componen los consorcios microbianos degradadores previamente aislados.
- 5.2 Determinar la capacidad de biodegradación cruzada de imidacloprid y de al menos otro neonicotinoide a escala matraz, de consorcios microbianos aislados de un suelo expuesto con anterioridad a imidacloprid.
- 5.3 Describir la biodegradación de imidacloprid, acetamiprid y tiametoxan por parte del consorcio microbiano de mejor rendimiento, durante la operación de un biorreactor en discontinuo.
- 5.4 Determinar los cambios en la ecotoxicidad durante los procesos de biodegradación por medio de ensayos de toxicidad oral aguda en *Apis mellifera*, prueba de inhibición de la bioluminiscencia de *Aliivibrio fischeri* y germinación en semillas de *Lactuca sativa*.

CAPITULO II. METOLOGÍA

Se identificaron los microorganismos que componen dos comunidades microbianas previamente aisladas de un suelo agropecuario expuesto con anterioridad a imidacloprid, por medio de la amplificación y secuenciación del fragmento ADNr 16S e ITS2. Posteriormente fueron sometidas a ensayos en pequeña escala (250 mL) de degradación de imidacloprid, acetamiprid y tiametoxan en diferentes medios de cultivo. Mediante la cuantificación de los plaguicidas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (LC- MS/MS), se determinó la capacidad degradativa de los consorcios y se seleccionó el consorcio con mayor eficiencia en la degradación. A partir de estos datos, en un biorreactor de tanque agitado operado en discontinuo (3 L de volumen de trabajo), se procedió a determinar el tiempo de biodegradación de las mezclas imidacloprid-tiametoxan e imidacloprid-acetamiprid-tiametoxan. Se utilizaron estas combinaciones ya que son neonicotinoides muy utilizados en cultivos como tomate, papa y melón en el país. Finalmente, para determinar los cambios en la ecotoxicidad durante los procesos de biodegradación, se realizaron ensayos ecotoxicológicos en *Apis mellifera*, prueba de inhibición de la bioluminiscencia de *Aliivibrio fischeri* y germinación de semillas de *Lactuca sativa*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Identificación de los microorganismos del consorcio microbiano

Se identificaron los microorganismos que componen las dos comunidades microbianas aisladas de un suelo agropecuario expuesto con anterioridad a imidacloprid (Rodríguez-Castillo et al., 2018). Para ello, se separaron por medio de técnicas dependientes de cultivo las cepas que conforman el consorcio microbiano. Se describieron según la morfología de la colonia, color de la colonia, tinción de Gram y morfología al microscopio, utilizando tanto medio de cultivo Luria-Bertani (LB) como en el medio Bushnell Haas sin nitrógeno (BH-N) (Bushnell & Haas, 1941) enriquecido con glucosa (2 g L⁻¹) en placa petri. A cada cepa se le extrajo el ADN completo a partir de pellets celulares de las colonias de cultivos en fase sólida (muestras de 1 mL; 8000 g, 5 min), mediante un kit comercial PowerSoil DNA Extraction Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. El ADN

extraído se cuantificó y se comprobó su pureza mediante espectrofotometría (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.). Posteriormente, se amplificaron los genes ribosomales 16S (ADNr 16S) o ITS2 mediante PCR, y los productos de amplificación se purificaron utilizando ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (USB, Cleveland, OH, EE. UU.). Las condiciones de amplificación siguieron protocolos estándar de PCR para genes ribosomales, incluyendo ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión, tal como se ha descrito previamente en estudios de amplificación de ADN microbiano (Muyzer et al., 1993).

Los amplicones de PCR fueron secuenciados utilizando un analizador genético de electroforesis capilar ABI 3130 (Applied Biosystems) y el kit de secuenciación de ciclos BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los contigs resultantes se ensamblaron utilizando DNAbaser, y las secuencias se alinearon de manera múltiple mediante MAFFT 7 CRBC Server (Kato et al., 2017). Para determinar las relaciones filogenéticas, se construyó un árbol utilizando las secuencias parciales de ADNr 16S de los aislamientos bacterianos obtenidos en este estudio junto con secuencias de otras bacterias degradadoras de imidacloprid recuperadas de GenBank (Kandil et al., 2015; Pandey et al., 2009; Phugare et al., 2013). El análisis se realizó utilizando el software MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), empleando 5 millones de generaciones y estableciendo una fracción de descarte (*burn-in*) de 0,25. El criterio de información bayesiano fue seleccionado mediante Mega7 (Tamura et al., 2011). Las secuencias existentes de otras bacterias fueron recuperadas de GenBank. El árbol fue editado con Inkscape 0.92.2.

6.2. Capacidad degradativa de los consorcios aislados

Los dos consorcios previamente aislados y clasificados como capaces de degradar imidacloprid fueron evaluados para determinar su capacidad de degradar este compuesto de forma cruzada con otros neonicotinoideos, siguiendo el procedimiento modificado descrito por Cullington y Walker (1999). Para ello, se activó una suspensión del consorcio almacenada a -70°C en medio Caldo Tripticasa y Soya (CTS) con 20% de glicerol. Esta suspensión se cultivó en 50 mL de medio de cultivo líquido de sales minerales sin nitrógeno (BH-N) y enriquecido con glucosa (2 g L⁻¹) e imidacloprid (50 mg L⁻¹), en agitación constante

a 130 rpm, una temperatura de 27°C, en oscuridad, durante 48 h. Este crecimiento se utilizó como inóculo para los ensayos de degradación.

Para evaluar la capacidad de eliminación de imidacloprid cruzada con otros neonicotinoides, ambos consorcios se inocularon en matraces que contenían 100 mL de medio de cultivo líquido BH-N estéril (pH=6.5) enriquecido con 2 g L⁻¹ glucosa y los insecticidas de alta pureza (≥98%), alcanzando una densidad celular estimada de 1,0 x 10⁸ UFC mL⁻¹ (estimadas por recuento en placa). Se utilizó un conjunto análogo de matraces para evaluar la eliminación de imidacloprid solo (50 mg L⁻¹), tiametoxan solo (50 mg L⁻¹) y en combinación de ambos (50 mg L⁻¹ cada uno), así como controles sin inocular para estimar pérdidas de plaguicidas debido a factores abióticos durante 31 días. Los ensayos de degradación de acetamiprid (50 mg L⁻¹) e imidacloprid (50 mg L⁻¹) de forma individual se realizaron de manera similar, en medio líquido BH-N enriquecido con glucosa y en CTS, durante un periodo de tratamiento de 14 días.

El ensayo se realizó por duplicado en matraces volumétricos de vidrio que fueron incubados en agitación a 160 rpm, a 28°C y en oscuridad. Al inicio y al final del tratamiento se tomaron muestras de 1 mL de cada una de las réplicas para cuantificar la concentración de los insecticidas por medio de LC-MS/MS.

6.3. Eliminación de neonicotinoides a escala reactor

Con base en los resultados de los ensayos anteriores, se procedió a describir la biodegradación de dos mezclas de tres neonicotinoides (imidacloprid-tiametoxan e imidacloprid-tiametoxan-acetamiprid) en un biorreactor de tanque agitado discontinuo (Marca: Applikon Biotechnology, Modelo: Z611000720). El biorreactor es un contenedor estéril de 7 L de capacidad y 3 L de volumen de trabajo, operado en modo discontinuo, con agitación mecánica mediante dos impulsores tipo Rushton, con un sistema de regulación de temperatura, un sistema de inyección de aire por medio de un difusor interno, un sensor de nivel, temperatura, pH y un sistema de control de dichos parámetros.

El inóculo se preparó previamente en cuatro matraces que contienen 150 mL de medio BH-N (pH=6,5) complementado con 2 g L⁻¹ glucosa y 50 mg L⁻¹ de imidacloprid y 500 µL de

consorcio microbiano (se calculó la cantidad de inóculo para que la población final sea de $1,0 \times 10^5$ UFC mL⁻¹ en el biorreactor, por medio de conteo colonial en placa); estos cultivos se agitaron a 160 rpm durante 5 días y se emplearon como inóculo en los reactores.

Se cargó un reactor con 2,7 L de medio de cultivo BH-N, suplementado con 50 mg L⁻¹ de imidacloprid y tiametoxan de uso agrícola (cada uno), una solución de melaza con 2 g L⁻¹ de glucosa y 300 mL de inóculo, para una concentración inicial de 1×10^5 UFC mL⁻¹ en el biorreactor. Posteriormente, se cargó otro reactor con 2,7 L de medio BH-N con 2 g L⁻¹ de glucosa y 50 mg L⁻¹ de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid de formulación comercial (cada uno) y 300 mL de inóculo a la misma concentración que el anterior. La agitación fue mediante dos impulsores a 250 rpm y aire continuamente a 0,5 L min⁻¹. Todos los reactores se mantuvieron a 25 °C en la oscuridad con un pH inicial de 6,5 (el pH fue monitoreado, pero no controlado durante la operación).

Como controles abióticos, se cargaron de forma simultánea al tratamiento, dos reactores adicionales con 3 L de medio BH-N con 2 g L⁻¹ de glucosa, 50 mg L⁻¹ de cada uno con los respectivos plaguicidas, se operaron en las mismas condiciones y de forma simultánea a cada tratamiento. Las concentraciones de plaguicidas se determinaron a los 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21, 24, 28 y 30 días por medio de LC-MS/MS y los ensayos ecotoxicológicos se realizaron en muestras tomadas a los tiempos 0, 14 y 30 d, como se describe en la sección 6.5. Las curvas de degradación de los insecticidas se construyeron a partir de los datos generados por medio del software Sigma Plot versión 16.

6.4. Cuantificación de plaguicidas

Los análisis de insecticidas neonicotinoides (imidacloprid, tiametoxan, acetamiprid) y el producto de transformación ácido 6-cloronicotínico se realizaron a partir de muestras centrifugadas y filtradas por LC-MS/MS usando cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC-1290 Infinity LC, Agilent Technologies, CA) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (modelo 6460).

Las muestras se diluyeron por duplicado con una mezcla de agua:acetonitrilo (1:1 v/v), ambos acidificados con ácido fórmico (0,1% v/v), antes de la inyección. La separación

cromatográfica se realizó a 40 °C inyectando 6 µL de muestras en una columna Poroshell 120 EC-C18 (100 mm x 2,1 mm d.i., tamaño de partícula 2,7 mm) y utilizando agua acidificada (ácido fórmico 0,1 % v/v, A) y metanol acidificado (ácido fórmico 0,1% v/v, B) como fases móviles. El flujo de la fase móvil fue de 0,3 mL min⁻¹ en las siguientes condiciones: 30 % B durante 3 min, seguido de un gradiente lineal de 15 min al 100 % B, 4 min al 100 % B y 0,1 min de gradiente de vuelta al 30 % B, seguido de 5 min en condiciones iniciales. Las transiciones seleccionadas, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para los analitos se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros analíticos del método LC-MS/MS para la cuantificación de neonicotinoides y productos de transformación

Compuesto	Transición MRM (m/z)	Tiempo de retención (min)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Imidacloprid	256 → 209	4,5–5,0	~0.01	~0.03
Tiametoxan	292 → 211	5,2–5,7	~0.02	~0.05
Acetamiprid	223 → 126	3,8–4,2	~0.01	~0.03
Ácido 6-cloronicotínico	158 → 98	2,5–3,0	~0.02	~0.05

6.5. Ensayos ecotoxicológicos durante la eliminación en biorreactores

6.5.1. Ensayo de germinación de semillas

Para determinar los cambios en la ecotoxicidad durante los procesos de biodegradación en escala biorreactor, se realizaron ensayos de germinación de semillas con lechuga (*Lactuca sativa* var. Georgia) (USEPA, 1996). La germinación relativa de la semilla (GR), el alargamiento relativo de la raíz (AR) y el índice de germinación (IG), se determinaron utilizando 10 semillas expuestas a 5 mL de muestras de biorreactor, luego de 6 días de incubación en la oscuridad a 22°C (Departamento de Agricultura de EE. UU. Consejo estadounidense de compostaje, 2001). Estos parámetros se determinaron al comparar con los controles de germinación obtenidos por exposición al agua destilada, como lo describen Huete-Soto et al., (2017). Los valores de IG se calcularon en Excel y los resultados se compararon mediante ANOVA de dos vías y pruebas post hoc de Tukey utilizando Minitab Statistical Software 22 para determinar si se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos.

6.5.2. Test oral agudo en abejas melíferas

La prueba basada en la toxicidad aguda por vía oral de los plaguicidas en abejas obreras adultas (*Apis mellifera*) se realizó siguiendo el método propuesto por la OECD 214 (1998). Se emplearon abejas adultas sanas de la misma raza y edad similar que fueron proporcionadas y escogidas por un apicultor local. Las abejas recolectadas fueron asignadas aleatoriamente, diez individuos por jaula de prueba y privadas de alimento durante 2 h antes del comienzo de la prueba. Se expusieron las jaulas a cuatro dosis (correspondientes a las diluciones de las muestras del reactor) por triplicado, en una serie geométrica con un factor 2 y que cubren el rango de DL_{50} . A cada grupo de prueba de abejas se le proporcionó 200 μ L de solución de sacarosa al 50 % p/v, que contenía la dilución de la muestra a la concentración apropiada; cuatro grupos de control recibieron solución de sacarosa sola. Una vez consumido (dentro de 3-4 h), el alimento fue retirado de la jaula y reemplazado con una mezcla de sacarosa y miel como alimento, provisto *ad libitum*. La mortalidad se registró diariamente durante al menos 72 h para compararla con el control. Las abejas se mantuvieron en la oscuridad en una habitación experimental a una temperatura de 25 ± 2 °C y una humedad relativa de alrededor del 50-70 %. Las DL_{50} se determinan usando la prueba de probabilidad binomial en el software de análisis de datos de toxicidad TOXCALC de Tidepool Scientific Software.

6.5.3. Ensayo de inhibición de la bioluminiscencia de *Aliivibrio fischeri*.

El procedimiento experimental está basado en el protocolo ISO 11348-3 (ISO 11348-3:2007, 1998), utilizando el bioensayo Microtox® M500 (Rodríguez-Rodríguez et al., 2011). El porcentaje de inhibición de la luminiscencia de la bacteria *Aliivibrio fischeri* (anteriormente clasificada como *Vibrio fischeri*), se determinó comparando la respuesta dada por un control salino con la respuesta de la respectiva muestra diluida, después de un tiempo de exposición de 15 min. Se definió como el valor CE_{50} , a la concentración relativa de la muestra (considerando la muestra pura como 100 %) que provoca una inhibición del 50% en la bioluminiscencia producida por la bacteria.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de los microorganismos de los consorcios microbianos

Mediante técnicas dependientes de cultivo se aislaron nueve microorganismos pertenecientes a dos consorcios microbianos (N1 y N2), aislados previamente de un suelo agropecuario expuesto con anterioridad a imidacloprid. Se realizó una descripción morfológica de los microorganismos que componen ambas comunidades microbianas, se describió la morfología de la colonia, la morfología celular y la tinción de Gram (ver cuadro 3).

Cuadro 3. Descripción morfológica de los aislamientos microbianos.

Consortio	Código de aislamiento	Cepa más cercana (GenBank)	Morfología de la colonia	Morfología celular	Tinción de Gram
N1	CN2MF2	<i>Kocuria rhizophila</i>	Redondas pequeñas, brillantes, color amarillo fuerte	Cocos	Gram Positivo
N1	CN2MF3	<i>Paraburkholderia phymatum</i>	Redondas, pequeñas, brillantes, color blanco-crema	Bacilos cortos	Gram negativo
N1	CN2MF4	<i>Rhodotorula toruloides</i>	Redondas grandes, brillantes, color rosado-papaya	Levaduras	No aplica Gram
N1	CN2MF6	<i>Paenibacillus odorifer</i>	Redondas pequeñas, brillantes, color blanco	Bacilos largos	Gram positivo
N2	CN5MF1A	<i>Paenibacillus odorifer</i>	Redondas pequeñas, brillantes, amarillas	Bacilos	Gram positivo
N2	CN5MF1B	<i>Rhodococcus aetherivorans</i>	Redondas grandes, brillantes, color crema-rosado claro	Coco-bacilo	Gram positivo
N2	CN5MF2	<i>Microbacterium binotii</i>	Pequeñas, poco pigmentadas*	Coco-bacilo	Gram positivo
N2	CN5MF3	<i>Microbacterium binotii</i>	Redondas pequeñas, brillantes, color crema	Cocos	Gram positivo
N2	CN5MF6	<i>Pseudacidovorax intermedius</i>	Redondas grandes, brillantes, amarillo claro	Bacilos	Gram negativo

*Cepas que crecieron solamente en agar BH-N.

Se realizó la identificación microbiana tanto para el consorcio N1 como para N2 mediante la secuenciación de la región 16S rRNA para bacterias y del marcador ITS2 para hongos levaduriformes, comparando las secuencias obtenidas con la base de datos GenBank. Como resultado se reporta la identificación de ocho cepas bacterianas estrechamente relacionadas con los géneros *Paenibacillus* (98,32 %), *Rhodococcus* (96,84 %), *Microbacterium* (98,08 y 99,19 %), *Kocuria* (98,92 %), *Paraburkholderia* (99,32 %) y *Pseudacidovorax* (98,63 %), y una cepa de levadura estrechamente relacionada con el género *Rhodotorula* (99,84 %), como se muestra en el cuadro 4. Los niveles de similitud con las secuencias de referencia oscilaron entre 96,77 % y 99,84 %, indicando una alta concordancia con las especies más cercanas reportadas en la base de datos GenBank.

Cuadro 4. Aislamientos de los consorcios degradadores de imidacloprid, identificadas a partir de las secuencias ARNr 16S o ITS2 en la base de datos GenBank.

Consorcio	Aislamiento	Cepa más cercana (GenBank)	Número de acceso de la cepa más cercana	% Similitud (No. de bases comparadas)	Identificación del aislamiento
N1	CN2MF2	<i>Kocuria rhizophila</i>	Y16264	98,92 (1383)	<i>Kocuria rhizophila</i>
N1	CN2MF3	<i>Paraburkholderia phymatum</i> STM815	CP001043	99,32 (1183)	<i>Paraburkholderia phymatum</i>
N1	CN2MF4	<i>Rhodotorula toruloides</i> cultivo CBS:12015	KY104915.1	99,84 (630)	<i>Rhodotorula toruloides</i>
N1	CN2MF6	<i>Paenibacillus odorifer</i> cepa DSM 15391	CP009428	98,39 (1243)	<i>Paenibacillus sp.</i>
N2	CN5MF1A	<i>Paenibacillus odorifer</i> cepa DSM 15392	CP009428	96,77 (1425)	<i>Paenibacillus sp.</i>
N2	CN5MF1B	<i>Rhodococcus aetherivorans</i> cepa 10bc312	AF447391	96,84 (1328)	<i>Rhodococcus sp.</i>
N2	CN5MF2	<i>Microbacterium binotii</i> cepa CIP 101303	EF567306	98,08 (1357)	<i>Microbacterium sp.</i>
N2	CN5MF3	<i>Microbacterium binotii</i> cepa CIP 101304	EF567307	99,19 (1365)	<i>Microbacterium binotii</i>
N2	CN5MF6	<i>Pseudacidovorax intermedius</i> cepa CC-21	EF469609	98,63 (1390)	<i>Pseudacidovorax sp.</i>

El análisis filogenético de las cepas microbianas de los consorcios, las cepas estrechamente relacionadas y las secuencias de otras bacterias degradadoras de imidacloprid se muestra en forma de árbol filogenético (Figura 1). Las cepas bacterianas aisladas en este trabajo se agruparon en clases como Bacilli, Actinomycete y Betaproteobacteria.

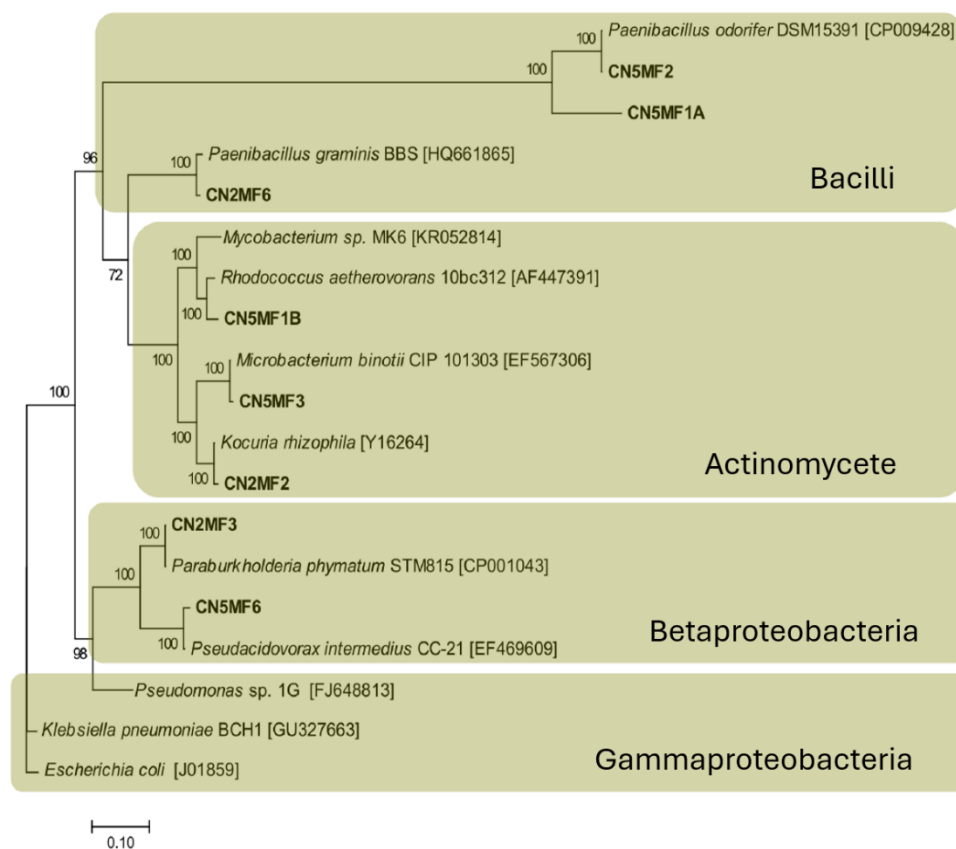


Figura 1. Filogenia bayesiana de aislamientos bacterianos del consorcio degradador de imidacloprid dentro de las distintas clases.

7.2. Capacidad degradativa de los consorcios aislados

Los consorcios se emplearon para evaluar la capacidad de eliminación de imidacloprid, tiametoxan y su combinación en ensayos a escala de matraz (Cuadro 5). Los controles no inoculados revelaron pérdidas abióticas (25 % - 30 % para cada plaguicida) después de 31 días. Ambos consorcios mostraron una eliminación significativa de los insecticidas, el N1 eliminó tanto el imidacloprid (70,0 %) como el tiametoxan (51,8 %) cuando se aplicaron individualmente; sin embargo, cuando los plaguicidas se trataron simultáneamente, solo se eliminó significativamente el imidacloprid (69,2 %). Por otro lado, N2 solo eliminó el imidacloprid (96,2 % en el tratamiento individual, y 91,7 % en una mezcla binaria con

tiametoxan), aunque en mayor medida que N1. Estos resultados indican que al menos uno de los consorcios degradadores de imidacloprid (N1) también es capaz de degradar el tiametoxan, aunque solamente de forma individual en este ensayo.

Cuadro 5. Concentración residual de neonicotinoides en ensayos de eliminación en fase líquida con diferentes consorcios bacterianos.

Conorcios	Plaguicida residual después de 31 días (% con respecto a la concentración inicial) *		Plaguicida residual después de 14 días (% con respecto a la concentración inicial)			
	Imidacloprid	Tiametoxan	Imidacloprid		Acetamiprid	
			BH-N	CTS	BH-N	CTS
Control Abiótico	75,2 (73,1)	72,4 (71,6)	58,8	70,8	71,0	94,7
N1	30,0 (30,8)	48,2 (67,7)	39,6	53,1	58,8	73,0
N2	3,8 (8,3)	76,9 (76,5)	40,4	60,7	57,8	69,3

*Los valores corresponden a la eliminación individual; los valores entre paréntesis corresponden al tratamiento simultáneo de ambos insecticidas.

Adicionalmente se realizó un ensayo a escala de matraz comparando la eliminación individual de imidacloprid y acetamiprid en el medio de cultivo BH-N y CTS, utilizando ambos consorcios degradadores. En el caso del imidacloprid, se logró una mayor eliminación en BH-N (60,4 % - 59,6 %) que en CTS (46,9 % - 39,3 %) para ambos consorcios (Cuadro 4). Aunque con baja eficiencia, los consorcios aislados también fueron capaces de transformar el acetamiprid; obteniendo una mayor eliminación en BH-N (41,2 % - 42,2 %) que en CTS (27,0 % - 30,7 %). En este punto, se ha demostrado que el consorcio N1 es capaz de transformar imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid, mientras que el efecto del consorcio N2 solo es notable en imidacloprid y acetamiprid.

7.3. Eliminación de neonicotinoides a escala reactor

Dado el amplio espectro de eliminación que presenta el consorcio N1 (imidacloprid, tiametoxan, acetamiprid de forma individual), este se seleccionó para ampliar el proceso mediante reactores de tanque agitado de 5 L para la eliminación de dos mezclas diferentes de insecticidas neonicotinoides en operación en discontinuo. No se observó una eliminación abiótica significativa de plaguicidas en los reactores durante el tratamiento, lo que sugiere que la eliminación puede atribuirse al efecto de la biomasa microbiana viable (Figuras 2 y

3). De hecho, se observó un rápido crecimiento del consorcio en el medio en presencia de los tres insecticidas, pasando de $2,5 \times 10^5$ UFC/L en el momento de la inoculación a $9,3 \times 10^{10}$ UFC/L después de 3 días de tratamiento.

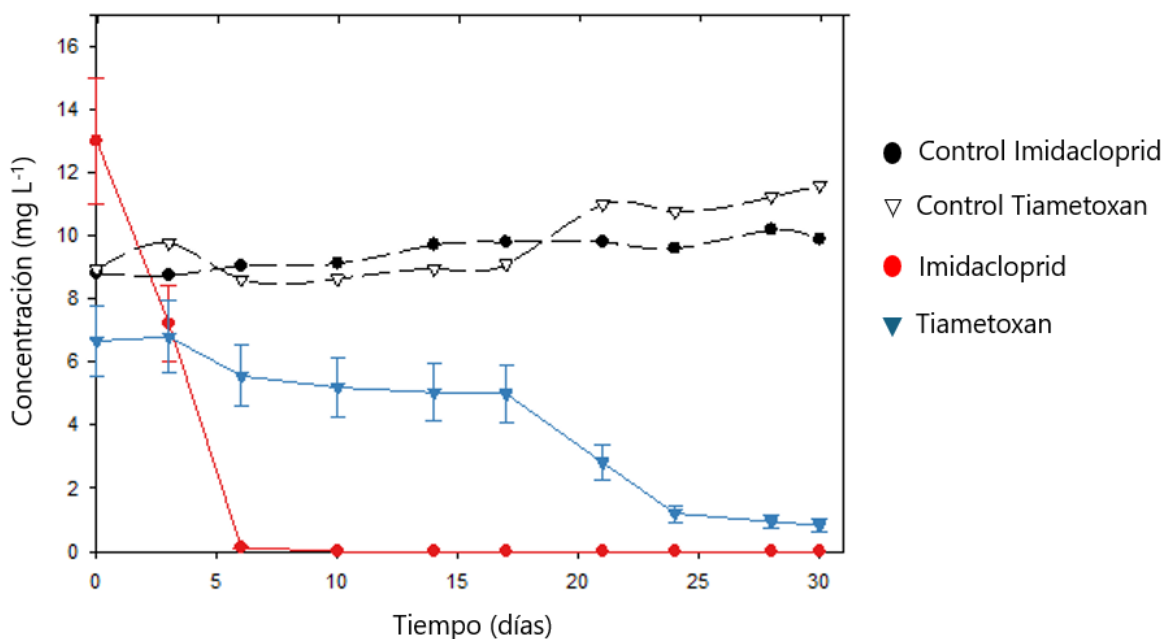


Figura 2. Perfiles de eliminación durante el tratamiento simultáneo de imidacloprid y tiametoxan por el consorcio microbiano N1 en un biorreactor de tanque agitado en discontinuo. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas analizadas.

Un primer ensayo que contenía la mezcla binaria imidacloprid y tiametoxan fue capaz de eliminar completamente el imidacloprid después de 10 días (>99 % de eliminación en 6 días) y el 87,6 % del tiametoxan después de 30 días (Figura 2). Un segundo ensayo por lotes que trató simultáneamente la mezcla ternaria de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid eliminó completamente el imidacloprid después de 17 días, aunque a un ritmo más lento que en el reactor que contenía la mezcla binaria; el acetamiprid también se eliminó (99,9 %) después de 28 días (Figura 3). Por otro lado, la eliminación del tiametoxan no pareció verse afectada por la presencia del plaguicida adicional, y se eliminó el 87,3 % después de 30 días. Cabe destacar que el ácido 6-cloronicotínico, un producto de transformación común de los neonicotinoides de primera generación (imidacloprid, acetamiprid) (Hao et al., 2016), no se detectó en los reactores.

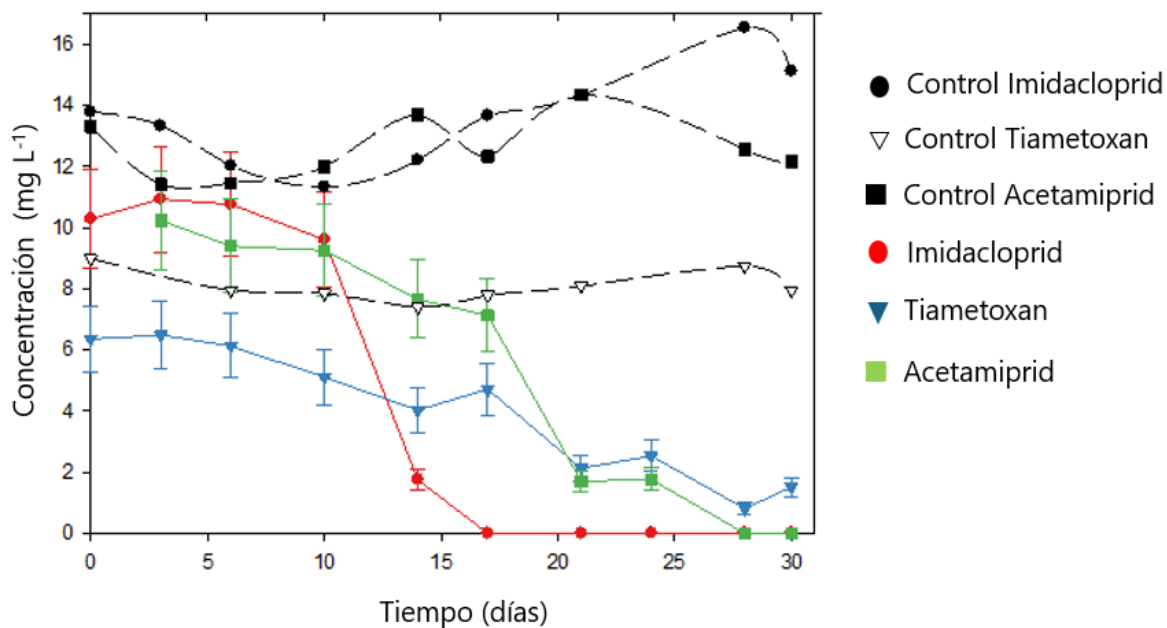


Figura 3. Perfiles de eliminación durante el tratamiento simultáneo de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid por el consorcio microbiano N1 en un biorreactor de tanque agitado en discontinuo. Las barras representan la desviación estándar de las réplicas analizadas.

Se detectó una fase de latencia aparente de unos 10 días en la transformación del imidacloprid cuando se trató juntamente con tiametoxan y acetamiprid (Figura 3), pero no en la mezcla binaria con tiametoxan. Dicha fase de latencia retrasó, pero no inhibió, la eliminación completa de este insecticida.

7.4. Ensayos ecotoxicológicos durante la eliminación en biorreactores

Teniendo en cuenta el efecto nocivo de los neonicotinoides sobre los organismos no objetivo, y en particular sobre los polinizadores, la transformación de los neonicotinoides no es suficiente para garantizar la viabilidad ecológica del proceso, ya que el tratamiento podría dar lugar a la formación de productos de transformación tóxicos. A este respecto, se realizaron ensayos ecotoxicológicos para estimar el potencial de detoxificación del tratamiento en el reactor. Las pruebas de germinación de semillas utilizando lechuga como biomarcador de fitotoxicidad (Figura 4) mostraron valores iniciales del Índice de Germinación del 74,4 % y el 67,4 % para el reactor que trataba las mezclas binarias y ternarias, respectivamente. Aunque las diferencias relacionadas con el tiempo no fueron significativas en todos los casos, se observó una detoxificación (vinculada al aumento de los

valores de IG), especialmente en el reactor utilizado para el tratamiento de dos insecticidas, cuyo IG se acercaba al 100 % después de 14 días. Los valores de IG (y, en general, la detoxificación aparente) fueron menores en el sistema que contenía la mezcla ternaria de insecticidas.

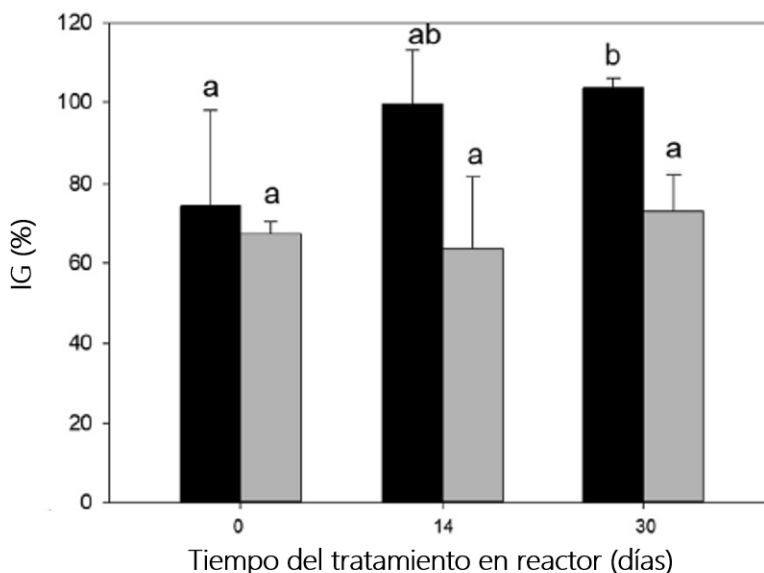


Figura 4. Variación del porcentaje del índice de germinación de *Lactuca sativa* como indicador de ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides, durante su tratamiento en un biorreactor de tanque agitado con un consorcio microbiano. Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises). Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en el índice de germinación ($p < 0,05$).

Los ensayos de inhibición de la bioluminiscencia con *A. fischeri* revelaron una clara detoxificación tras el tratamiento con la mezcla binaria, lo que aumentó drásticamente el valor CE_{50} tras 14 días de tratamiento (Figura 5), donde la disminución de la toxicidad fue superior al 99,99 %. Por el contrario, en el tratamiento de la mezcla ternaria no se estimó ninguna detoxificación de forma significativa.

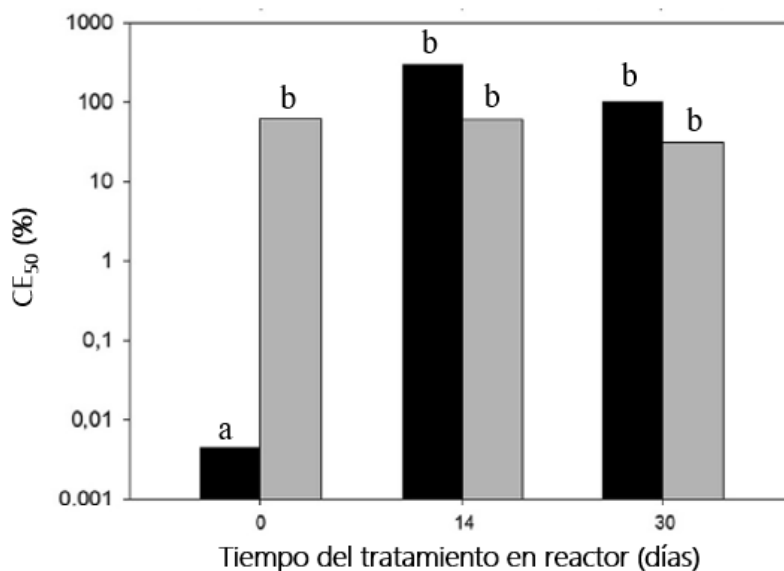


Figura 5. Variación de la ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides durante su tratamiento en un biorreactor de tanque agitado con un consorcio microbiano, evaluada mediante inhibición de la bioluminiscencia de *A. fischeri* y expresada como concentración efectiva media (CE₅₀). Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises).

Debido a la preocupación actual sobre la toxicidad de los neonicotinoides para los insectos polinizadores, se realizaron pruebas orales agudas en abejas melíferas como parte del monitoreo ecotoxicológico durante su eliminación en el biorreactor (Figura 6). Los valores de toxicidad más altos se registraron al comienzo del tratamiento, aunque más altos en el sistema que contenía la mezcla binaria. En general, el proceso fue capaz de reducir la toxicidad de las mezclas de plaguicidas, no obstante, la detoxificación fue más rápida en el reactor que trataba la mezcla binaria de neonicotinoides, que presentó valores de toxicidad residual más bajos al final del tratamiento. La detoxificación alcanzó el 75,0 % después de 14 días y el 93,8 % después de 31 días en este sistema. Por otro lado, en el reactor que contenía la mezcla ternaria, la detoxificación solo fue evidente al final del proceso, alcanzando el 81,8 % después de 31 días.

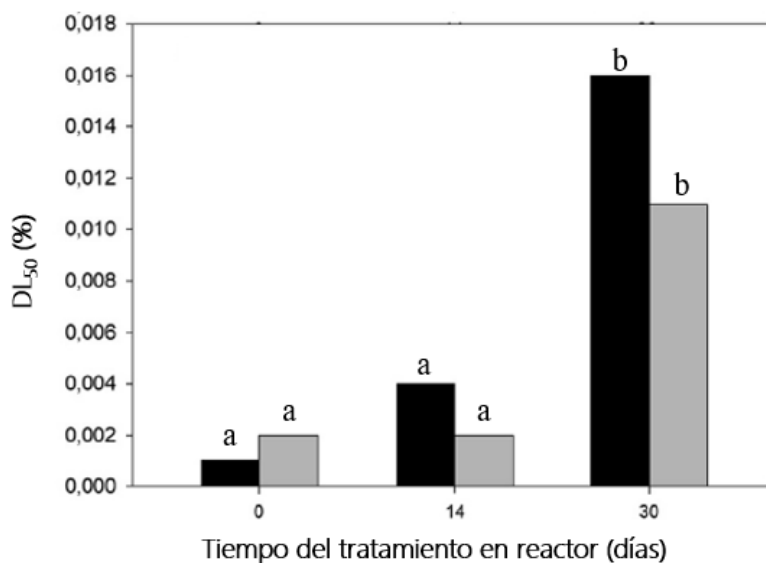


Figura 6. Variación de la ecotoxicidad en aguas residuales sintéticas con neonicotinoides durante su tratamiento en un biorreactor de tanque agitado con un consorcio microbiano, evaluada mediante el ensayo de toxicidad oral aguda en abejas melíferas *Apis mellifera* y expresada como dosis letal media (DL₅₀). Eliminación simultánea de imidacloprid y tiametoxan (barras negras); eliminación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid (barras grises).

8. DISCUSIÓN

8.1. Identificación de los microorganismos del consorcio microbiano

Las cepas bacterianas aisladas en este trabajo se agruparon en tres clases: Bacilli, Actinomycete y Betaproteobacteria. Al comparar estos organismos con algunas cepas degradadoras de neonicotinoides descritas en la literatura científica, queda claro que la capacidad metabólica para transformar estos plaguicidas está presente en organismos taxonómicamente distantes. Aunque no se ha evaluado la capacidad de degradación de las cepas individuales de los consorcios N1 y N2, los informes sobre la degradación del imidacloprid (u otros neonicotinoides) por parte de cepas pertenecientes a los géneros más cercanos identificados son limitados.

Al igual que en este estudio, Sabourmoghaddam, Zakaria y Omar (2015) aislaron y caracterizaron cepas bacterianas capaces de degradar imidacloprid a partir de suelos

hortícolas preexpuestos a este plaguicida. Entre las 50 cepas bacterianas aisladas del suelo, *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Pseudomonas putida* F1, *Bacillus subtilis* y *Rhizobium* sp. fueron capaces de degradar entre el 25,36 % y el 45,48 % de la cantidad inicial de imidacloprid a una concentración de 25 mg L⁻¹ en medios con Carbono limitado. Estos resultados demuestran la eficacia del uso de bacterias del suelo para la degradación microbiana del imidacloprid y el posible uso para la biorremediación de suelos contaminados con este plaguicida.

Se sabe poco sobre los genes y las vías metabólicas relacionados con la degradación del imidacloprid. El actinomiceto del género *Mycobacterium* sp. identificado en el consorcio N2 fue reportado por Kandil et al., (2015) como cepa degradadora que utiliza imidacloprid como única fuente de nitrógeno, logrando transformar el 99,7 % del plaguicida a ácido 6-cloronicotínico (6-CNA) en menos de dos semanas. Este hallazgo sugiere que ciertas cepas de este género pueden realizar degradación metabólica del compuesto original. En el caso de *Rhodococcus*, se ha demostrado que la cepa BCH-2 degradó acetamiprid en un proceso cometabólico mediado por la formación de 6-CNA (Phugare & Jadhav, 2015). Además, Guo et al., (2019), determinaron que otro actinomiceto, *Streptomyces canus*, logró degradar acetamiprid mediante la hidrólisis del grupo cianoimina mediado por la enzima nitrilo hidratasa que lograron purificar. Este tipo de enzimas, implicadas en la transformación de nitrilos presentes en muchos neonicotinoides, podrían estar presentes en algunos miembros del consorcio microbiano en estudio.

En cuanto al género *Bacillus*, se ha documentado su participación en consorcios degradadores de imidacloprid generando la formación de metabolitos de 6-CNA y nitrosoguanidina (Sharma, Singh & Gupta, 2014). También de forma individual, la cepa *Bacillus aerophilus* logró degradar imidacloprid en un suelo con una vida media de 25 días a una concentración de 50 mg kg⁻¹ y la generación del 6-CNA como metabolito (Akoijam & Singh, 2015). Para la degradación de tiametoxan, Rana et al., (2015) reportan que la bacteria *Bacillus aeromona* logró reducir la concentración de este plaguicida utilizándolo como fuente de carbono y nitrógeno.

Otras Betaproteobacterias como *Burkholderia* y *Paraburkholderia*, han sido reportadas por su notable capacidad metabólica para transformar compuestos xenobióticos, incluyendo

neonicotinoides (Pang et al., 2020). Específicamente *Burkholderia cepacia* cepa CH9, fue reportada por Gopal et al., (2011), como capaz de degradar 69 % de imidacloprid en un medio rico en sales minerales.

En contraste, Gammaproteobacterias como *Pseudomonas* sp. 1G (Pandey et al., 2009) y *Klebsiella pneumoniae* cepa BCH1 (Phugare et al., 2013) han sido reportadas como degradadoras de imidacloprid y probablemente utilizan vías cometabólicas en presencia de fuentes alternativas de carbono para provocar la transformación del neonicotinoide. Además, *Pseudomonas* destacan por su versatilidad ecológica, lo que les permite sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de plaguicidas y formar biopelículas que mejoran la estabilidad de los consorcios degradadores (Lima et al., 2020).

La identificación de una levadura dentro del consorcio microbiano N1 amplía el espectro de microorganismos reconocidos con potencial biorremediador de neonicotinoides. Se ha reportado que la cepa IM-2 de *Rhodotorula mucilaginosa* degrada eficazmente mediante hidrólisis el acetamiprid y el tiacloprid en un medio de sal mineral y sacarosa con vidas medias de 3,7 y 14,8 días, respectivamente (Dai et al., 2010). Esta capacidad se asocia con la presencia de enzimas oxidativas inespecíficas (como monooxigenasas y deshidrogenasas) que facilitan la ruptura del anillo nicotínico o la reducción de grupos nitro y ciano, rutas también observadas en bacterias degradadoras (Pang et al., 2020). En este contexto, la coexistencia de una levadura con bacterias sugiere una posible sinergia metabólica, donde la levadura podría intervenir en pasos oxidativos o cometabólicos, facilitando la transformación posterior por bacterias heterotróficas.

Al igual que con otros microorganismos degradadores de neonicotinoides, se necesita más investigación para describir la vía de degradación utilizada por los consorcios N1 y N2, y la contribución individual de sus miembros en el proceso. Sin embargo, la presencia simultánea de representantes de tres clases en un mismo consorcio sugiere una posible complementariedad metabólica, en la que distintas rutas enzimáticas actúan de manera sinérgica para la degradación cruzada de compuestos estructuralmente similares. Este tipo de interacción podría explicar la eliminación simultánea de imidacloprid, acetamiprid y tiametoxan observada en este estudio, reforzando que los consorcios mixtos ofrecen ventajas ecológicas y funcionales frente al uso de cepas individuales (Kumar et al., 2024).

8.2. Capacidad degradativa de los consorcios aislados

Diversos autores han observado que la eficiencia en la eliminación de insecticidas neonicotinoides por microorganismos aislados tiende a aumentar cuando estos se cultivan en medios con una mayor disponibilidad de nutrientes orgánicos o sales, que estimulan el metabolismo microbiano (Anhalt et al., 2007; Shetti & Kaliwal, 2012; Pang et al., 2020). Por esta razón, se realizó un ensayo a escala de matraz para comparar la degradación individual de imidacloprid y acetamiprid empleando dos consorcios degradadores (N1 y N2) en medios BH-N (rico en carbono y limitado en nitrógeno) y CTS (medio más balanceado).

Los resultados demostraron que ambos consorcios presentaron una mayor eliminación del imidacloprid y acetamiprid, en medio BH-N que en CTS, lo que sugiere que las condiciones de limitación nitrogenada podrían inducir la expresión de rutas metabólicas implicadas en la degradación de neonicotinoides. Esto se ha demostrado en *Mycobacterium* sp. MK6 que pudo degradar 99,7 % de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de imidacloprid en menos de dos semanas, siendo el plaguicida la única fuente de nitrógeno (Kandil et al., 2015).

Aunque la evidencia directa para neonicotinoides es todavía limitada, revisiones sobre la biodegradación microbiana de estos plaguicidas señalan que factores nutritivos y de balance Carbono-Nitrógeno influyen en la actividad enzimática y rutas metabólicas implicadas (Pang et al., 2020). Esta tendencia podría estar relacionada con la disponibilidad de carbono como fuente energética, que favorece los procesos cometabólicos descritos para este tipo de compuestos (Pang et al., 2020; Elango et al., 2023).

Este ensayo también permitió evaluar la capacidad de degradación cruzada de los consorcios, dando como resultado que el consorcio N1 es capaz de degradar los tres insecticidas (imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid) en condiciones de BH-N enriquecido con carbono. En contraste, el consorcio N2 exhibió una degradación más selectiva, con alta eficiencia para imidacloprid y acetamiprid, pero menor rendimiento frente a tiametoxan, lo que podría reflejar diferencias en la composición microbiana o en la disponibilidad de enzimas clave, como hidrolasas y monooxigenasas (Zeng et al., 2024). Este comportamiento sugiere la existencia de rutas enzimáticas compartidas o inducibles que permiten la transformación de compuestos estructuralmente relacionados, como se ha descrito en consorcios mixtos capaces

de atacar varios neonicotinoides (Pang et al., 2020). Resultados similares han sido reportados para consorcios bacterianos integrados por *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, los cuales presentan variabilidad en la capacidad de degradar diferentes neonicotinoides según la fuente de carbono y nitrógeno disponible en el medio (Elango et al., 2023; Randhawa et al., 2024).

Sin embargo, cabe señalar que la degradación en matraz no siempre se traduce directamente a escalas mayores debido a factores como difusión de oxígeno, inhibición por metabolitos acumulados, competencia microbiana y limitaciones de volumen, los cuales pueden afectar el rendimiento efectivo en biorreactores. En revisiones sobre bioremediación microbiana de neonicotinoides se destaca que los ensayos en matraz proporcionan datos de cinética y rutas metabólicas, pero deben complementarse con escalamiento y pruebas en sistemas más representativos (Pang et al., 2020; Randhawa, 2024).

8.3. Eliminación de neonicotinoides a escala reactor

Con el propósito de describir la biodegradación cruzada de tres neonicotinoides mediante el consorcio N1, se realizó un ensayo de eliminación durante la operación de un biorreactor en discontinuo. Este tratamiento simultáneo reveló que todos los neonicotinoides analizados fueron degradados eficazmente por el consorcio microbiano, siendo el imidacloprid el compuesto de eliminación más rápida en ambos sistemas. Esto podría explicarse debido a que el consorcio fue aislado y enriquecido inicialmente en presencia de imidacloprid, lo que pudo haber favorecido la selección de microorganismos con afinidad metabólica hacia este compuesto, explicando su degradación más eficiente en comparación con los otros insecticidas.

El acetamiprid, una molécula más pequeña con una vida media más corta en el medio ambiente (Lewis et al., 2016), se eliminó más lentamente que el imidacloprid, mientras que el tiametoxan presentó los porcentajes más bajos de eliminación, manteniendo aproximadamente un 13 % de la concentración inicial tras el tratamiento. Este comportamiento es coherente con la mayor estabilidad química que reporta el tiametoxan y su vida media más prolongada en ambientes acuáticos (Lewis et al., 2016; Pang et al., 2020).

El desempeño del consorcio N1 a escala reactor superó ampliamente la eficiencia obtenida en los ensayos a escala matraz (Cuadro 4). Las condiciones de operación controladas del biorreactor, incluyendo la aireación forzada, la mayor homogeneidad y una mejor transferencia de masa de oxígeno, probablemente favorecieron la actividad biológica y la eliminación acelerada de los plaguicidas. Este resultado concuerda con lo reportado en la literatura donde la transición de sistemas estáticos o agitados a reactores con control de oxígeno y pH ha mostrado incrementos significativos en la eficiencia de biodegradación (Randhawa et al., 2024).

En conjunto, la eliminación global de neonicotinoides en los biorreactores alcanzó valores del 95,8 % y del 94,4 % en las mezclas binarias y ternarias respectivamente, tras el periodo de operación de 30 días (Figuras 2 y 3). Estos valores superan los porcentajes de eliminación de neonicotinoides reportados en la literatura para cepas individuales de *Klebsiella pneumoniae* BCH1 (78 % en 7 días), *Streptomyces canus* CGMCC 13662 (70 % en 2 días), *Hymenobacter latericoloratus* (64 % en 4 días), *Pseudomonas fluorescens* (67 % en 24 días) y *Brucella intermedium* PDB13 (90 % en 10 días) (Phugare et al., 2013; Guo et al., 2019; Guo et al., 2020; Zamule et al., 2021; Elango et al., 2023). Dado que estos estudios fueron realizados a escala de laboratorio y con compuestos individuales, el uso de un consorcio microbiano en un sistema reactor para el tratamiento simultáneo de múltiples insecticidas representa un aporte relevante hacia la aplicación biotecnológica de estos procesos en matrices contaminadas.

Los consorcios microbianos han demostrado ser más eficaces que las cepas aisladas para la biorremediación de compuestos recalcitrantes, debido a su diversidad metabólica y a la cooperación funcional entre sus miembros, que permite realizar transformaciones secuenciales y complementarias (Smith et al., 2005). Los escasos reportes en la literatura del uso de consorcios degradadores, indican resultados satisfactorios en la eliminación de plaguicidas individuales, pero no tan eficientes como los resultados reportados en esta investigación. Por ejemplo, Xu et al., (2020), aislaron un consorcio microbiano compuesto en su mayoría por betaproteobacterias, capaz de degradar completamente acetamiprid (50 mg L⁻¹ en 144 h). Erguven y Yildirim (2019), aislaron *M. radiotolerans* y *M. arthrosphaerae* de un campo de cultivo de maíz y prepararon consorcios de ambas bacterias logrando

porcentajes de eliminación de imidacloprid de 88,4 % durante 18 días. Mientras que Sharma, Singh & Gupta, (2014) reportaron degradación de 93 % de este mismo plaguicida en 54 días por un consorcio de *Bacillus sp.* Estos resultados comparativos refuerzan la eficacia del consorcio N1 en el tratamiento de mezclas de neonicotinoides a escala reactor.

En este estudio, la eliminación del imidacloprid fue más rápida en la mezcla binaria que en la ternaria, lo cual podría deberse a la coexistencia de acetamiprid con los otros dos plaguicidas, generando un periodo de latencia para la adaptación enzimática, posibles efectos inhibitorios o competencia por rutas metabólicas compartidas. Por ejemplo, la degradación de imidacloprid suele involucrar rutas de oxidación del anillo imidazolidina, reducción del grupo nitro y pérdida del grupo nitro (Pang et al., 2020); mientras que acetamiprid puede inducir vías de N-desalquilación y ruptura del enlace C–N (Elango et al., 2023), lo cual podría producir intermediarios que actúen como inhibidores para las enzimas que también participan en la degradación del imidacloprid. Además, los metabolitos generados por el catabolismo de acetamiprid podrían ejercer toxicidad o efectos de retroinhibición sobre miembros del consorcio, ralentizando la cinética global. Pang et al. (2020) mencionan que la coexistencia de varios neonicotinoides puede generar competencia enzimática o efectos antagónicos, provocando tiempos de latencia en las etapas tempranas de la degradación o alterando la eficacia microbiana para degradar cada compuesto.

Cabe destacar que el ácido 6-CNA, un producto de transformación común de los neonicotinoides de primera generación y con potenciales efectos subletales para la ecotoxicidad acuática (Hao et al., 2016; Malev et al., 2012), no fue detectado en los biorreactores. Esta ausencia podría deberse a que el compuesto no se generó en cantidades apreciables o bien a que fue rápidamente transformado por el consorcio microbiano, impidiendo su acumulación a niveles detectables. Se ha reportado que *Bradyrhizobiaceae sp.* SG-6C tuvo la capacidad de eliminar completamente 6-CNA (Shettigar et al., 2012), que en otros estudios se ha detectado como producto principal de la transformación del imidacloprid y el acetamiprid por cepas degradadoras de *Mycobacterium sp* (Kandil et al., 2015) y *Rhodococcus sp.* (Phugare & Jadhav, 2015), respectivamente.

8.4. Variaciones ecotoxicológicas durante la eliminación en biorreactores

Las pruebas de germinación de semillas utilizando lechuga como biomarcador de fitotoxicidad (Figura 4) mostraron una detoxificación (vinculada al aumento de los valores de IG), especialmente en el reactor utilizado para el tratamiento de dos insecticidas, cuyo IG se acercaba al 100 % después de 14 días. Los valores de IG (y en general, la detoxificación aparente) fueron menores en el sistema que contenía la mezcla ternaria de insecticidas. Por lo tanto, la presencia adicional de acetamiprid y la mayor concentración residual de tiametoxan en este último reactor pueden ser las causas de estos resultados, dado que en este sistema se espera que se forme una mayor diversidad de productos de transformación en comparación con el reactor que contiene la mezcla binaria. Este comportamiento coincide con lo descrito en la literatura sobre los efectos en la toxicidad de mezclas de plaguicidas debido a las posibles interacciones entre los compuestos y la acumulación de metabolitos, según las concentraciones relativas y la naturaleza química de los compuestos involucrados (Verbruggen, 2010; Lydy et al., 2004).

Maloney et al., (2020) reportaron que las combinaciones de imidacloprid y tiametoxan mostraron efectos sinérgicos sobre el bioindicador *Chironomus dilutus* bajo condiciones de exposición aguda, lo que indica que la toxicidad de las mezclas puede ser mayor que la suma de los compuestos individuales. Además, la presencia de productos de transformación derivados de la degradación de los insecticidas puede modificar sustancialmente el perfil toxicológico del sistema. Algunos metabolitos de neonicotinoides presentan toxicidades comparables o incluso superiores a las de los compuestos parentales, y una mayor persistencia en medios acuáticos y suelos (Borsuah et al., 2020; Zhang et al., 2023).

Los ensayos de inhibición de la bioluminiscencia con *A. fischeri* revelaron una clara detoxificación tras el tratamiento con la mezcla binaria, lo que aumentó drásticamente el valor CE₅₀ tras 14 días de tratamiento (Figura 5), llegando a una disminución de la toxicidad superior al 99,99 %. Este resultado coincide con estudios previos que reportan una marcada disminución de la toxicidad en sistemas biológicos tras la biodegradación de neonicotinoides, atribuida a la degradación parcial o completa de los compuestos parentales (Guo et al., 2020; Xu et al., 2020).

Por el contrario, en el tratamiento de la mezcla ternaria no se estimó ninguna detoxificación, posiblemente debido a la toxicidad relativamente baja e inesperada determinada al inicio del tratamiento en el reactor (tiempo cero), que era similar a la CE_{50} al final del tratamiento. Este comportamiento podría explicarse por interacciones antagonistas o sinérgicas entre los compuestos y sus productos de transformación. En particular, interacciones antagonistas entre imidacloprid y acetamiprid han sido observadas en organismos acuáticos y microbianos, donde la presencia de uno reduce la biodisponibilidad o la unión del otro a receptores nicotínicos (Beketov & Liess, 2008). Estos resultados indican que la reducción de la toxicidad no depende únicamente de la eliminación química de los neonicotinoides, sino también de la naturaleza y toxicidad de los metabolitos generados.

Se realizaron pruebas orales agudas en abejas melíferas para evaluar si la biodegradación en reactor podría disminuir efectivamente la toxicidad de las mezclas de insecticidas (Figura 6). La literatura reporta que el imidacloprid y el tiametoxan presentan una alta toxicidad oral aguda en abejas melíferas, con valores de DL_{50} de 0,0037 y 0,005 $\mu\text{g abeja}^{-1}$, respectivamente, mientras que el acetamiprid muestra una toxicidad considerablemente menor ($DL_{50} = 14,5 \mu\text{g abeja}^{-1}$) (University of Hertfordshire, 2023). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, las interacciones entre los tres plaguicidas y sus productos de transformación durante el proceso de tratamiento dificultan la predicción del comportamiento ecotoxicológico final. Como era de esperar, los valores de toxicidad más altos se registraron al inicio del tratamiento, especialmente en el sistema que contenía la mezcla binaria, lo cual puede atribuirse a la mayor concentración inicial de imidacloprid, el compuesto más tóxico para las abejas, detectada en ese reactor.

En general, el proceso fue capaz de reducir la toxicidad de las mezclas de plaguicidas para las abejas, lo que se correlaciona con la eliminación de los insecticidas. No obstante, la detoxificación fue más rápida en el reactor que trataba la mezcla binaria de neonicotinoides, que en el reactor que contenía la mezcla ternaria. Tal y como se describe en las pruebas de germinación de semillas, la presencia adicional de acetamiprid y su eliminación más lenta en comparación con el imidacloprid, podrían generar la presencia de metabolitos tóxicos para las abejas en este caso (Maloney et al., 2020; Sanchez-Bayo & Goka, 2014). Además, a pesar de lograr una detoxificación en términos relativos clara y significativa, la concentración

residual de tiametoxan puede ejercer efectos subletales residuales sobre la navegación y supervivencia de abejas, como lo mostró Henry et al., (2012) que documentaron fallas de retorno en abejas tras exposición subletal a este plaguicida.

Dado que, después de 30 días de tratamiento, el tiametoxan permaneció en concentraciones cercanas a 1 mg L^{-1} en ambos sistemas, sería conveniente evaluar períodos de tratamiento más prolongados o implementar estrategias complementarias que potencien la eliminación de los residuos persistentes. Los sistemas híbridos biofísico-químicos pueden potenciar la remoción de metabolitos resistentes y reducir la toxicidad residual del efluente tratado (Cui et al., 2024). Entre las alternativas adicionales viables se encuentran los procesos de oxidación avanzada (Fenton, fotocátalisis o peróxido de hidrógeno/UV), que han demostrado eficacia en la degradación de neonicotinoides y sus metabolitos (Patil, Bote & Gogate, 2014; Wang, Wang & Dionysiou, 2023). La adsorción en biochar o carbón activado puede servir como un tratamiento secundario para remover compuestos recalcitrantes, reduciendo la carga tóxica residual de los efluentes (Cui et al., 2024). Además, la co-inoculación con hongos ligninolíticos, como *Phanerochaete chrysosporium* o *Trametes versicolor*, ha mostrado un notable potencial para degradar insecticidas neonicotinoides mediante la acción de enzimas oxidativas como la lacasa y la peroxidasa de manganeso (Chen et al., 2021).

Se recomienda además la aplicación de múltiples bioindicadores en los ensayos de eliminación de neonicotinoides, para obtener una evaluación integral de los efectos ecotoxicológicos de los residuos post-tratamiento. En este sentido, la incorporación de organismos acuáticos sensibles, plantas y polinizadores como *Apis mellifera* permite evaluar los efectos subletales y la detoxificación efectiva del sistema. Según el conocimiento del autor, este estudio constituye el primer enfoque que evalúa la degradación biológica de neonicotinoides mediante múltiples ensayos ecotoxicológicos complementarios, incluyendo abejas melíferas como bioindicadores de relevancia ecológica.

CAPITULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

9. CONCLUSIONES

La caracterización de los consorcios microbianos aislados a partir de un suelo agropecuario expuesto a imidacloprid permitió identificar una comunidad diversa compuesta por bacterias pertenecientes a los géneros *Paenibacillus*, *Rhodococcus*, *Microbacterium*, *Kocuria*, *Paraburkholderia* y *Pseudacidovorax*, así como una levadura del género *Rhodotorula*. Aunque algunas de estas cepas no habían sido descritas previamente como degradadoras de imidacloprid, su coexistencia sugiere una posible complementariedad metabólica que permite la transformación secuencial de compuestos recalcitrantes.

Los ensayos a escala de matraz demostraron que ambos consorcios son capaces de transformar neonicotinoides, aunque con distintas eficiencias. El consorcio N1 mostró una degradación simultánea de imidacloprid, tiametoxan y acetamiprid, mientras que el consorcio N2 exhibió una mayor afinidad por imidacloprid y acetamiprid. Además, la mayor eficiencia observada en el medio BH-N sugiere que las condiciones de limitación de nitrógeno y enriquecimiento de carbono favorecen la expresión de rutas catabólicas específicas asociadas a la utilización de estos insecticidas como fuente alternativa de energía y carbono.

A escala biorreactor, el consorcio N1 mantuvo su capacidad de degradación eliminando más del 87 % de los tres neonicotinoides evaluados en 30 días. La mayor tasa de eliminación correspondió al imidacloprid, seguido del acetamiprid y el tiametoxan. Asimismo, la operación del reactor evidenció que la aireación y la transferencia de masa de oxígeno fueron factores determinantes en la eficiencia del proceso, lo cual ofrece bases para futuras escalas piloto o de tratamiento continuo. Estos hallazgos posicionan al consorcio N1 como un candidato biotecnológico para el desarrollo de tecnologías de depuración sostenibles en entornos agrícolas.

Los ensayos ecotoxicológicos mostraron una reducción significativa de la toxicidad en los sistemas tratados, especialmente en el reactor con la mezcla binaria de insecticidas, donde la detoxificación superó el 90 %. Estos resultados subrayan la importancia de evaluar los efectos combinados de plaguicidas y sus productos de transformación, ya que las

interacciones sinérgicas o antagonistas pueden alterar la toxicidad final del sistema. Asimismo, la integración de distintos bioindicadores permitió obtener una visión más completa de la detoxificación, aportando evidencia sobre la viabilidad ecológica del proceso biológico.

Los resultados obtenidos validan la hipótesis planteada: un consorcio microbiano aislado de un suelo expuesto a imidacloprid puede degradar de forma simultánea imidacloprid y otros neonicotinoides en un sistema líquido. Este trabajo demuestra que la adaptación microbiana inducida por el uso agrícola de plaguicidas puede ser aprovechada para desarrollar procesos biotecnológicos de remediación ambiental. En conjunto, los hallazgos ofrecen una base científica sólida para avanzar hacia el diseño de biorreactores aplicados al tratamiento de aguas contaminadas con insecticidas y abren la posibilidad de escalar estos sistemas en escenarios de campo, integrando su monitoreo con ensayos ecotoxicológicos multiespecíficos.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados de esta investigación confirman el potencial del consorcio microbiano N1 como herramienta biotecnológica para la eliminación simultánea de neonicotinoides en sistemas de tratamiento líquido. No obstante, para avanzar hacia su aplicación práctica y comprender plenamente su desempeño ecológico y funcional, se proponen las siguientes líneas de trabajo y recomendaciones:

- Se recomienda evaluar condiciones operativas más amplias en el reactor (por ejemplo, variaciones en la aireación, agitación y el pH) que permitan optimizar la actividad del consorcio. Del mismo modo, extender los periodos de tratamiento podría favorecer la degradación completa del tiametoxan y la eliminación de metabolitos intermedios persistentes.
- Para alcanzar una detoxificación más completa de las aguas residuales contaminadas, se sugiere integrar el proceso biológico con tecnologías complementarias como procesos de oxidación avanzada, adsorción en biochar, o co-inoculación con hongos ligninolíticos.

- Es necesario caracterizar los genes, enzimas y rutas metabólicas involucradas en la degradación de los neonicotinoides. El uso de secuenciación metagenómica, transcriptómica o proteómica permitiría identificar las enzimas clave y comprender las interacciones metabólicas entre los miembros del consorcio.
- Los resultados obtenidos a escala de laboratorio deben validarse con cargas y mezclas de plaguicidas de uso en suelos agrícolas y con medios de cultivo más simples. Esto permitirá ajustar los parámetros del reactor y evaluar su eficiencia bajo variaciones climáticas y de carga contaminante.
- Se recomienda incluir un panel más diverso de bioindicadores (organismos acuáticos, invertebrados del suelo, plantas nativas) y aplicar ensayos crónicos de toxicidad para determinar la seguridad ecológica del proceso a largo plazo.
- Los hallazgos de este estudio refuerzan la necesidad de integrar tecnologías biológicas en los marcos de gestión de residuos agrícolas y de promover políticas que favorezcan el uso de biorremediación como parte de estrategias nacionales de agricultura sostenible y protección de polinizadores.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, S., Cui, D., Zhong, G., & Liu, J. (2021). Microbial technologies employed for biodegradation of neonicotinoids in the agroecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 12, 759439.
- Akoijam, R., & Singh, B. (2015). Biodegradation of imidacloprid in sandy loam soil by *Bacillus aerophilus*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 95(8), 730-743.
- Anhalt, J. C., Moorman, T. B., & Koskinen, W. C. (2007). Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42(5), 509-514.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthoff, E., Escher, BI. (2011). Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquatic toxicology*. 103:38-45.
- Beketov, M. A., & Liess, M. (2008). Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 55(2), 247-253.
- Borsuah, J. F., Messer, T. L., Snow, D. D., Comfort, S. D., & Mittelstet, A. R. (2020). Literature review: Global neonicotinoid insecticide occurrence in aquatic environments. *Water*, 12(12), 3388.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 653.
- Byrne, F. J., & Toscano, N. C. (2006). Uptake and persistence of imidacloprid in grapevines treated by chemigation. *Crop Protection*, 25(8), 831-834.
- Castillo, M. D. P., Torstensson, L., & Stenström, J. (2008). Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use-A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6206-6219.
- Castro-Gutiérrez, V., Masís-Mora, M., Caminal, G., Vicent, T., Carazo-Rojas, E., Mora-López, M., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2016). A microbial consortium from a biomixture swiftly degrades high concentrations of carbofuran in fluidized-bed reactors. *Process Biochemistry*, 51(10), 1585-1593.
- Chen, A., Li, W., Zhang, X., Shang, C., Luo, S., Cao, R., & Jin, D. (2021). Biodegradation and detoxification of neonicotinoid insecticide thiamethoxam by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*, 417, 126017.

- Chen, S., Sun, D., Chung, JS. (2007). Treatment of pesticide wastewater by moving-bed biofilm reactor combined with Fenton-coagulation pretreatment. *Journal of Hazardous Materials*, 144:577-584.
- Chin-Pampillo, J. S., Ruiz-Hidalgo, K., Masis-Mora, M., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2015). Adaptation of biomixtures for carbofuran degradation in on-farm biopurification systems in tropical regions. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 9839-9848.
- Chiovarou, E. D., & Siewicki, T. C. (2008). Comparison of storm intensity and application timing on modeled transport and fate of six contaminants. *Science of the total environment*, 389(1), 87-100.
- CICOPLAFEST (2004). Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SAGARPA, SEDESOL, México, D. F. 481 pp.
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 49, 81-90.
- Cruzeiro, C., Rocha, E., & Rocha, M. J. (2018). Pesticides in worldwide aquatic systems: Part II. *Estuary*.
- Cui, S., Lv, J., Hough, R., Fu, Q., An, L., Zhang, Z., Ke, Y., Liu, Z., & Li, Y. F. (2024). Recent advances and prospects of neonicotinoid insecticides removal from aquatic environments using biochar: Adsorption and degradation mechanisms. *Science of the Total Environment*, 939, 173509.
- Cullington, J. E., & Walker, A. (1999). Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(5), 677-686.
- Dai, Y. J., Ji, W. W., Chen, T., Zhang, W. J., Liu, Z. H., Ge, F., & Yuan, S. (2010). Metabolism of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and thiacloprid by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain IM-2. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4), 2419-2425.
- Damalas, CA. (2009). Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essay*. 4(10):945-949.
- Declan, B. (2018) Scientists hail European ban on bee-harming pesticides. *Nature news*. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/d41586-018-04987-4>

- Díaz, J. M. C., Martin-Laurent, F., Beguet, J., Nogales, R., & Romero, E. (2017). Fate and effect of imidacloprid on vermicompost-amended soils under dissimilar conditions: risk for soil functions, structure, and bacterial abundance. *Science of the Total Environment*, 579, 1111-1119.
- Dively, G. P., & Kamel, A. (2012). Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4449-4456.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Tchamitchian, S., Bonnet, M., Cousin, M., & Le Conte, Y. (2016). Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific reports*, 6, 31430.
- EFSA, European Food Safety Authority. (2012). Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal*, 10(6), 2752.
- Elango, D., Siddharthan, N., Alaqueel, S. I., Subash, V., Manikandan, V., Almansour, A. I., & Jayanthi, P. (2023). Biodegradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid by earthworm gut bacteria *Brucella intermedium* PDB13 and its ecotoxicity. *Microbiological Research*, 268, 127278.
- Erguven, G. O., & Yildirim, N. (2019). The evaluation of imidacloprid remediation in soil media by two bacterial strains. *Current Microbiology*, 76(12), 1461-1466.
- Eskenazi, B., Bradman, A., & Castorina, R. (1999). Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environmental health perspectives*, 107(Suppl 3), 409.
- FAO (2002). Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Adoptado por el 123° Período de Sesiones del Consejo de la FAO. Roma, pp 31.
- Flores-Céspedes, F., González-Pradas, E., Fernández-Pérez, M., Villafranca-Sánchez, M., Socias-Viciano, M., & Urena-Amate, M. D. (2002). Effects of dissolved organic carbon on sorption and mobility of imidacloprid in soil. *Journal of Environmental Quality*, 31(3), 880-888.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2025, 15 de julio). *Pesticides use and trade, 1990–2023*. FAOSTAT highlights. <https://www.fao.org/statistics/highlights-archive/highlights-detail/pesticides-use-and-trade-1990-2023>

- Gamón, M., Sáez, E., Gil, J., & Boluda, R. (2003). Direct and indirect exogenous contamination by pesticides of rice-farming soils in a Mediterranean wetland. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 44(2), 0141-0151.
- Gopal, M., Dutta, D., Jha, S. K., Kalra, S., Bandyopadhyay, S., & Das, S. K. (2011). Biodegradation of imidacloprid and metribuzin by *Burkholderia cepacia* strain CH9. *Pesticide Research Journal*, 23(1), 36-40.
- Goulson, D. (2013). An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.
- Guo, L., Dai, Z., Guo, J., Yang, W., Ge, F., & Dai, Y. (2020). Oligotrophic bacterium *Hymenobacter latericoloratus* CGMCC 16346 degrades the neonicotinoid imidacloprid in surface water. *Amb Express*, 10(1), 7.
- Guo, L., Fang, W. W., Guo, L. L., Yao, C. F., Zhao, Y. X., Ge, F., & Dai, Y. J. (2019). Biodegradation of the neonicotinoid insecticide acetamiprid by actinomycetes *Streptomyces canus* CGMCC 13662 and characterization of the novel nitrile hydratase involved. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(21), 5922-5931.
- Gupta, S., Gajbhiye, V. T., & Gupta, R. K. (2008). Soil dissipation and leaching behavior of a neonicotinoid insecticide thiamethoxam. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 80(5), 431-437.
- Hao, C., Noestheden, M. R., Zhao, X., & Morse, D. (2016). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of neonicotinoid pesticides and 6-chloronicotinic acid in environmental water with direct aqueous injection. *Analytica Chimica Acta*, 925, 43-50.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Huete-Soto, A., Masís-Mora, M., Lizano-Fallas, V., Chin-Pampillo, J. S., Carazo-Rojas, E., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2017). Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: detoxification and effect of oxytetracycline. *Chemosphere*, 169, 558-567.

- Hussain, S., Hartley, C. J., Shettigar, M., & Pandey, G. (2016). Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. *FEMS microbiology letters*, 363(23).
- ISO 11348-3:2007, 1998. Water Quality - Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio Fischeri* (Luminescent Bacteria Test) - Part 3: Method Using Freeze-Dried Bacteria.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.
- Jemec, A., Tišler, T., Drobne, D., Sepčić, K., Fournier, D., & Trebše, P. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 68(8), 1408-1418.
- Jeschke, P., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science*, 64(11), 1084-1098.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897-2908.
- Kandil, M. M., Trigo, C., Koskinen, W. C., & Sadowsky, M. J. (2015). Isolation and characterization of a novel imidacloprid-degrading *Mycobacterium* sp. strain MK6 from an Egyptian soil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(19), 4721-4727.
- Kanrar, B., Ghosh, T., Pramanik, S. K., Dutta, S., Bhattacharyya, A., & Dhuri, A. V. (2006). Degradation dynamics and persistence of imidacloprid in a rice ecosystem under West Bengal climatic conditions. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 77(5), 631-637.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K.D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings Bioinf.* 1e7. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kumar, A., Goutam, E., Thakur, R., Geetika, & Meshram, S. (2024). Microbial degradation of pesticides in the environment. In *Microbial Applications for Environmental Sustainability* (pp. 99-116). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Lamers, M., Anyusheva, M., La, N., Nguyen, V. V., & Streck, T. (2011). Pesticide Pollution in Surface-and Groundwater by Paddy Rice Cultivation: A Case Study from Northern Vietnam. *Clean-Soil, Air, Water*, 39(4), 356-361.

- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International*.
- Li, Y., Li, Y., Bi, G., Ward, T. J., & Li, L. (2023). Adsorption and degradation of neonicotinoid insecticides in agricultural soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(16), 47516-47526.
- Lima, J.Y., Moreira, C., Nunes-Freitas, P.N., Olchanheski, L.R., Veiga, S.A., Etto, R.M., Staley, C., Sadowsky, M.J., & Pileggi, M. (2020). Structuring biofilm communities living in pesticide contaminated water. *Heliyon*. 19;6(5):e03996.
- Lü, H., Wei, J. L., Tang, G. X., Chen, Y. S., Huang, Y. H., Hu, R., & Li, Q. X. (2024). Microbial consortium degrading of organic pollutants: Source, degradation efficiency, pathway, mechanism and application. *Journal of Cleaner Production*, 451, 141913.
- Lydy, M., Belden, J., Wheelock, C., Hammock, B., & Denton, D. (2004). Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecology and society*, 9(6).
- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., & Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(3), 178-186.
- Maloney, E. M., Morrissey, C. A., Headley, J., Peru, K. M., & Liber, K. (2020). Cumulative toxicity of neonicotinoid insecticide mixtures to *Chironomus dilutus* under acute exposure scenarios (vol 36, pg 3091, 2017). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(4), 942-946.
- Mineau, P., Palmer, C. (2013). Neonicotinoid insecticides and birds: the impact of the nation's most widely used insecticides on birds. *American Bird Conservancy*.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment international*, 74, 291-303.
- Mussali-Galante, P., Castrejón-Godínez, M. L., Díaz-Soto, J. A., Vargas-Orozco, Á. P., Quiroz-Medina, H. M., Tovar-Sánchez, E., & Rodríguez, A. (2023). Biobeds, a microbial-based remediation system for the effective treatment of pesticide residues in agriculture. *Agriculture*, 13(7), 1289.

- Muyzer, G., de Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Nauen, R., Jeschke, P., & Copping, L. (2008). In focus: neonicotinoid insecticides editorial. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 64(11), 1081-1081.
- Nzila, A. (2013). Update on the cometabolism of organic pollutants by bacteria. *Environmental pollution*, 178, 474-482.
- OECD. (1998). Guidelines for the testing of chemicals. 214. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test
- Oliver, J. B., Fare, D. C., Youssef, N., Scholl, S. S., Reding, M. E., Ranger, C. M., & Halcomb, No, O. T. (1998). 214: Honeybees, acute contact toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Publishing.
- Pandey, G., Dorrian, S. J., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (2009). Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. *Biochemical and biophysical research communications*, 380(3), 710-714.
- Pang, S., Lin, Z., Zhang, W., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2020). Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids. *Frontiers in microbiology*, 11, 868.
- Pathak, R. K., Kumar, S., & Singh, A. (2022). Microbial degradation of pesticides: Recent advances and future prospects. *Chemosphere*, 301, 134784.
- Patil, P. N., Bote, S. D., & Gogate, P. R. (2014). Degradation of imidacloprid using combined advanced oxidation processes based on hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics sonochemistry*, 21(5), 1770-1777.
- Pearce, S. L., Pandey, R., Dorrian, S. J., Russell, R. J., Oakeshott, J. G., & Pandey, G. (2011). Genome sequence of the newly isolated chemolithoautotrophic *Bradyrhizobiaceae* strain SG-6C. *Journal of bacteriology*, 193(18), 5057-5057.
- Phugare, S. S., & Jadhav, J. P. (2015). Biodegradation of acetamiprid by isolated bacterial strain *Rhodococcus* sp. BCH2 and toxicological analysis of its metabolites in silkworm (*Bombax mori*). *Clean–Soil, Air, Water*, 43(2), 296-304.
- Phugare, S. S., Kalyani, D. C., Gaikwad, Y. B., & Jadhav, J. P. (2013). Microbial degradation of imidacloprid and toxicological analysis of its biodegradation metabolites in silkworm (*Bombyx mori*). *Chemical engineering journal*, 230, 27-35.

- Rana, S., Jindal, V., Mandal, K., Kaur, G., & Gupta, V. K. (2015). Thiamethoxam degradation by *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from agricultural soils. *Environmental monitoring and assessment*, 187(5), 300.
- Randhawa, J. S. (2024). Microbial-assisted remediation approach for neonicotinoids from polluted environment. *Bulletin of the National Research Centre*, 48(1), 70.
- Rodríguez-Castillo, G., Molina-Rodríguez, M., Pérez-Villanueva, M., Masis-Mora, M., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2018). Removal of Two Neonicotinoid Insecticides and Mineralization of 14 C-Imidacloprid in Biomixtures. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 1-7.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Castro-Gutiérrez, V., Chin-Pampillo, J. S., & Ruiz-Hidalgo, K. (2013). On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. *FEMS microbiology letters*, 345(1), 1-12.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jelic, A., Llorca, M., Farré, M., Caminal, G., Petrovic, M., Barceló, D., Vicent, T., (2011). Solid-phase treatment with the fungus *Trametes versicolor* substantially reduces pharmaceutical concentrations and toxicity from sewage sludge. *Bioresource Technology*. 102, 5602-5608.
- Roessink, I., Merga, L. B., Zweers, H. J., & Van den Brink, P. J. (2013). The neonicotinoid imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(5), 1096-1100.
- Sabourmoghaddam, N., Zakaria, M. P., & Omar, D. (2015). Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14(2), 182-188.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PLoS one*, 9(4), e94482.
- Satheeshkumar, A., Duraimurugan, R., Velu, P., Muthukumar, B., Santhosh, S., Devanesan, S., Mohamad, A., & Rajasekar, A. (2025). Biodegradation pathway and mechanism of new emerging pollutants neonicotinoids. *Journal of Environmental Sciences*.
- Scholer, J., & Krischik, V. (2014). Chronic exposure of imidacloprid and clothianidin reduce queen survival, foraging, and nectar storing in colonies of *Bombus impatiens*. *PLoS One*, 9(3), e91573.

- Scholz, K., & Spiteller, M. (1992). Influence of groundcover on the degradation of super (14) C-imidacloprid in soil. *BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL, FARNHAM(UK).*, 883-888.
- Servicio Fitosanitario del Estado. (consultado en 2025). Disponible en: <http://app.sfe.go.cr/SFEInsumos/asp/Insumos/ConsultaRegistroPlaguicida.aspx>
- Shalaby, EM., Abdou, GY. (2010). The influence of soil microorganisms and bio- or -organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tube. *Journal of Plant Protection Research*. 50 (1):86-92.
- Sharma, A., Pankaj, P. K., Gangola, S., & Kumar, G. (2016). Microbial degradation of pesticides for environmental cleanup. *Bioremediation of industrial pollutants*, 178-205.
- Sharma, S., Singh, B., & Gupta, V. K. (2014). Biodegradation of imidacloprid by consortium of two soil isolated *Bacillus* sp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(5), 637-642.
- Sheets, L., Li, A., Minnema, D., Collier, R., Creek, M., Peffer, R. (2016). A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity, *Critical Reviews in Toxicology*, 46(2):153-190.
- Shetti, A. A., & Kaliwal, B. B. (2012). Biodegradation of imidacloprid by soil isolate *Brevundimonas* sp. MJ15. *Int J Curr Res*, 4(10), 100-106.
- Shettigar, M., Pearce, S., Pandey, R., Khan, F., Dorrian, S. J., Balotra, S., Russell, R., Oakesshott, J., & Pandey, G. (2012). Cloning of a novel 6-chloronicotinic acid chlorohydrolase from the newly isolated 6-chloronicotinic acid mineralizing *Bradyrhizobiaceae* strain SG-6C. *PLoS One*, 7(11), e51162.
- Shim, S., & Kawamoto, K. (2002). Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. *Water Research*. 36:4445-4454.
- Shukla, P. K., Kumar, G., Soni, S. K., Lal, S., Singh, N. S., Bhattacharjee, A. K., & Saxena, R. K. (2025). Biodegradation of thiamethoxam in mango orchards by *Pseudomonas* spp.: a study on soil health and sustainability. *BMC Environmental Science*, 2(1), 1-13.
- Smith, D., Alvey, S., & Crowley, D. E. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(2), 265-273.

- Starner, K., & Goh, K. S. (2012). Detections of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in surface waters of three agricultural regions of California, USA, 2010–2011. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(3), 316-321.
- Stoyanova, K., Gerginova, M., Peneva, N., Dincheva, I., & Alexieva, Z. (2023). Biodegradation and utilization of the pesticides glyphosate and carbofuran by two yeast strains. *Processes*, 11(12), 3343.
- Sun, S., Guo, J., Zhu, Z., & Zhou, J. (2024). Microbial degradation mechanisms of the neonicotinoids acetamiprid and flonicamid and the associated toxicity assessments. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1500401.
- Syracuse Environmental Research Associates (SERA). (2005). Imidacloprid: Human Health and Ecological Risk Assessment-Final Report. SERA TR 05-43-24-03a. Syracuse Environmental Research Associates, New York.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tapparo, A., Marton, D., Giorio, C., Zanella, A., Soldà, L., Marzaro, M., L., Vivan., & Girolami, V. (2012). Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental science & technology*, 46(5), 2592-2599.
- Tennekes, H. A. (2011). The significance of the Druckrey–Küpfmüller equation for risk assessment—The toxicity of neonicotinoid insecticides to arthropods is reinforced by exposure time: Responding to a Letter to the Editor by Drs. C. Maus and R. Nauen of Bayer *CropScience* AG. *Toxicology*, 280(3), 173-175.
- Tennekes, H. A., & Sanchez-Bayo, F. P. (2013). Time-dependent toxicity of neonicotinoids and other toxicants: implications for a new approach to risk assessment. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. S4:001.
- Thuyet, D. Q., Watanabe, H., & Motobayashi, T. (2011). Effect of formulations and treatment methods of nursery boxes applied with insecticide on the behavior of imidacloprid in rice paddy fields. *Journal of Pesticide Science*, 36(1), 9-15.
- Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B., Trebse, P., (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere*, 76:907-914.

- University of Hertfordshire. (2023). *Pesticide Properties DataBase (PPDB)*. Agriculture & Environment Research Unit (AERU). Retrieved from <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>
- USEPA, United States Environmental protection Agency. (1996). Seed germination/root elongation toxicity test. In: OPPTS Ecological Effect Guideline, 850 Series.
- USEPA, United States Environmental protection Agency. (2012) White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, United States Environmental protection Agency, Washington DC.
- van Dijk, T. C. (2010). Effects of neonicotinoid pesticide pollution of Dutch surface water on non-target species abundance. Tesis de maestría. Utrecht University, Utrecht.
- Vargas, E. (2022). Uso aparente de plaguicidas en la agricultura de Costa Rica. *United Nations Development Programme*, Costa Rica. (Informe PDF disponible en repositorios del SFE/PNUD - versión pública).
- Verbruggen, E. M. J., & Van den Brink, P. J. (2010). Review of recent literature concerning mixture toxicity of pesticides to aquatic organisms. *Parasites & Vectors*. RIVM Report 601400001/2010.
- Wachendorff-Neumann, U., Mauler-Machnik, A., Erdelen, C., Ohtake, H. (2012). Synergistic mixture of trifloxystrobin and imidacloprid. Google patents. United States: Bayer Cropscience AG.
- Wang, M., Yang, G., Wang, X., Yao, Y., Min, H., & Lu, Z. (2011). Nicotine degradation by two novel bacterial isolates of *Acinetobacter* sp. TW and *Sphingomonas* sp. TY and their responses in the presence of neonicotinoid insecticides. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(7), 1633-1640.
- Wang, G., Chen, X., Yue, W., Zhang, H., Li, F., & Xiong, M. (2013a). Microbial degradation of acetamiprid by *Ochrobactrum* sp. D-12 isolated from contaminated soil. *PloS one*, 8(12), e82603.
- Wang, G., Yue, W., Liu, Y., Li, F., Xiong, M., & Zhang, H. (2013b). Biodegradation of the neonicotinoid insecticide Acetamiprid by bacterium *Pigmentiphaga* sp. strain AAP-1 isolated from soil. *Bioresource technology*, 138, 359-368.
- Wang, G., Zhao, Y., Gao, H., Yue, W., Xiong, M., Li, F., Zhang, H., & Ge, W. (2013c). Co-metabolic biodegradation of acetamiprid by *Pseudoxanthomonas* sp. AAP-7 isolated from a long-term acetamiprid-polluted soil. *Bioresource technology*, 150, 259-265.

- Wang, R., Yuan, Y., Yen, H., Grieneisen, M., Arnold, J., Wang, D., Wang, C. & Zhang, M. (2019). A review of pesticide fate and transport simulation at watershed level using SWAT: Current status and research concerns. *Science of the total environment*, 669, 512-526.
- Wang, H., Wang, Y., & Dionysiou, D. D. (2023). Advanced oxidation processes for removal of emerging contaminants in water. *Water*, 15(3), 398.
- Xiang, X., Xie, Y., Tian, D., Chen, Z., Yi, X., Chen, Z., & Huang, M. (2024). Microbial degradation mechanism and pathway of the insecticide thiamethoxam by isolated *Bacillus cereus* from activated sludge. *Environmental Research*, 246, 117929.
- Xu, B., Xue, R., Zhou, J., Wen, X., Shi, Z., Chen, M., Xin, F., Zhang, W., Dong, W., & Jiang, M. (2020). Characterization of acetamiprid biodegradation by the microbial consortium ACE-3 enriched from contaminated soil. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1429.
- Yamamoto I, Yabuta G, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Kagabu S. (1995). Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *Journal of Pesticide Science*, 20(1), 33-40.
- Yamamoto, I., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T., Walcott, E. C., & Sumikawa, K. (1998). Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Insect Biochemistry and Physiology*. 37(1), 24-32.
- Yang, H., Wang, X., Zheng, J., Wang, G., Hong, Q., Li, S., Li, R. & Jiang, J. (2013). Biodegradation of acetamiprid by *Pigmentiphaga* sp. D-2 and the degradation pathway. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 95-102.
- Yang, H., Hu, S., Wang, X., Chuang, S., Jia, W., & Jiang, J. (2020). *Pigmentiphaga* sp. strain D-2 uses a novel amidase to initiate the catabolism of the neonicotinoid insecticide acetamiprid. *Applied and environmental microbiology*, 86(6), e02425-19.
- Zamule, S. M., Dupre, C. E., Mendola, M. L., Widmer, J., Shebert, J. A., Roote, C. E., & Das, P. (2021). Bioremediation potential of select bacterial species for the neonicotinoid insecticides, thiamethoxam and imidacloprid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111814.
- Zeng, Y., Sun, S., Li, P., Zhou, X., & Wang, J. (2024). Neonicotinoid insecticide-degrading bacteria and their application potencial in contaminated agricultural soil remediation. *Agrochemicals*, 3(1), 29-41.

- Zhang, Z., Zhang, X., Wang, Y., Zhao, Y., Lin, J., Liu, F., & Mu, W. (2016). Nitenpyram, dinotefuran, and thiamethoxam used as seed treatments act as efficient controls against *Aphis gossypii* via high residues in cotton leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(49), 9276-9285.
- Zhang, H., Zhang, Z., Song, J., Mei, J., Fang, H., & Gui, W. (2021). Reduced bacterial network complexity in agricultural soils after application of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam. *Environmental Pollution*, 274, 116540.
- Zhang, X., Huang, Y., Chen, W. J., Wu, S., Lei, Q., Zhou, Z., Mishra, S., Bhatt, P., & Chen, S. (2023). Environmental occurrence, toxicity concerns, and biodegradation of neonicotinoid insecticides. *Environmental Research*, 218, 114953.
- Zhou, G. C., Wang, Y., Zhai, S., Ge, F., Liu, Z. H., Dai, Y. J., Yuan, S., & Hou, J. Y. (2013). Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(9), 4065-4074.
- Zhou, G. C., Wang, Y., Ma, Y., Zhai, S., Zhou, L. Y., Dai, Y. J., & Yuan, S. (2014a). The metabolism of neonicotinoid insecticide thiamethoxam by soil enrichment cultures, and the bacterial diversity and plant growth-promoting properties of the cultured isolates. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49(6), 381-390.
- Zhou, L. Y., Zhang, L. J., Sun, S. L., Ge, F., Mao, S. Y., Ma, Y., Liu, Z. H., Dai, Y. J. & Yuan, S. (2014b). Degradation of the neonicotinoid insecticide acetamiprid via the N-carbamoylimine derivate (IM-1-2) mediated by the nitrile hydratase of the nitrogen-fixing bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC 7333. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(41), 9957-9964.