

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DIVERSIDAD Y PRESENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN
DIFERENTES AGROECOSISTEMAS DE COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título de
Doctorado Académico en Ciencias Agrícolas

LORENA URIBE LORÍO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

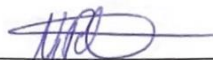
DEDICATORIA

A Bernal, Daniela, Alejandro y Luna

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me apoyaron en este camino, especialmente Lidieth, Daniela, Laura, Luis Felipe y el comité asesor.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Doctorado Académico en Ciencias Agrícolas.



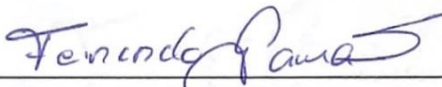
Ph.D. Natalia Barboza Vargas
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



Ph.D. Luis Felipe Arauz Cavallini
Director de Tesis



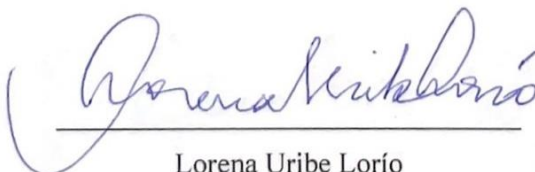
Ph.D. César Rodríguez Sánchez
Asesor de Tesis



Ph.D. Fernando García Santamaría
Asesor de Tesis



Ph.D. Catalina Salas Durán
Directora del Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas



Lorena Uribe Lorío
Candidata

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
TABLA DE CONTENIDO	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
INTRODUCCIÓN	1
BIBLIOGRAFÍA	3
OBJETIVOS	6
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
CAPÍTULO 1: DIVERSIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS AISLADAS DE CULTIVOS AGRÍCOLAS DE COSTA RICA.....	7
1.1 INTRODUCCIÓN	7
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.2.1 Aislamientos bacterianos	12
1.2.2 Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos	14
1.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	14
1.2.4 Identificación molecular de la colección de bacterias mediante análisis del gen ARN 16S ribosomal	14
1.3 RESULTADOS	15
1.3.1 Identificación de bacterias aisladas de lesiones en plantas	15
1.3.2 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos estreptomycinina, tetraciclina y gentamicina.	18
1.3.3 Relación Fitopatogenicidad (RH)-Resistencia	21
1.4 DISCUSIÓN	22
1.5. BIBLIOGRAFÍA	27
CAPÍTULO 2: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA EN EL PROCESO DE VERMICOMPOSTAJE DE EXCRETAS BOVINAS Y SU INFLUENCIA EN LA PRESENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A OXITETRACICLINA	36
2.1 INTRODUCCIÓN	36
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.2.1 Ubicación del estudio y colecta de excretas.....	40

2.2.2 Producción de vermicompost	40
2.2.3 Preparación del té de vermicompost	41
2.2.4 Recuperación de bacterias resistentes a tetraciclina	41
2.2.5 Extracción de ADN y análisis químicos	42
2.2.6 Secuenciación y procesamiento de secuencias	42
2.2.7 Análisis estadístico	43
2.3 RESULTADOS	44
2.3.1 Cambios en la estructura de las comunidades bacterianas durante el proceso de vermicompostaje	44
2.3.2 Precompostaje de excretas bovinas.....	44
2.3.3 Vermicompostaje	45
2.3.4 Té de vermicompost sin aditivos.....	48
2.3.5 Té de vermicompost suplementado con melaza.....	49
2.3.6 Presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en muestras del proceso de vermicompostaje	50
2.3.7 Análisis de géneros bacterianos presentes en comunidades cultivables resistentes del proceso de vermicompostaje.....	52
2.4 DISCUSIÓN	55
2.4.1 Precompostaje de excretas	55
2.4.2 Vermicompost.....	56
2.4.3 Té de vermicompost.....	58
2.4.4 Té de vermicompost suplementado con melaza.....	60
2.4.5 Análisis de géneros bacterianos en comunidades cultivables resistentes presentes en el proceso de vermicompostaje.....	62
2.5 BIBLIOGRAFÍA	65
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
ANEXO 1 MATERIAL SUPLEMENTARIO	80

RESUMEN

Este estudio empleó métodos dependientes e independientes de cultivo, secuenciación masiva y análisis bioinformático para explorar la diversidad de comunidades bacterianas en diversos agroecosistemas de Costa Rica, así como en el proceso de elaboración del té de vermicompost. Además, se investigó la presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos comúnmente utilizados en la protección de plantas y el tratamiento veterinario de ganado bovino.

Se identificaron 116 bacterias aisladas a partir de infecciones bacterianas en 19 cultivos, incluyendo hortalizas, frutales y ornamentales en Costa Rica. La secuenciación del gen ARN 16S y el sistema semiautomatizado Biolog revelaron 55 especies pertenecientes a 20 géneros bacterianos, destacando *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas* como los más abundantes. El 27% de los aislamientos se categorizó como patogénico mediante la Reacción Hipersensible (RH), incluyendo especies fitopatógenas, como *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *Pantoea anthophila* y *P. stewartii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dickeya oryzae*, *Erwinia billingiae*, *Pectobacterium aroidearum*, y *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. Se determinó la susceptibilidad a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y gentamicina de la colección mediante la prueba de difusión en disco y a las bacterias consideradas positivas se les determinó la Concentración mínima inhibitoria (CMI). Según las condiciones de este estudio, el 60% de las bacterias provenientes de 17 cultivos fueron clasificadas como resistentes a alguno de los antibióticos evaluados, encontrándose CMIs máximas en aislamientos de repollo, tomate, banano, chile dulce, apio, melón, cúrcuma, coliflor y palmito. Dentro de los géneros con mayor abundancia se determinó una proporción de aislamientos resistentes desde 86% (*Stenotrophomonas*) a 54% (*Pantoea*). La resistencia a estreptomicina fue la más frecuente (35%), seguida por tetraciclina (28%) y gentamicina (9%), y la proporción de resistencia en las bacterias con RH positiva fue mayor (74%) que en las RH negativa (54%).

Por otro lado, se analizaron mediante la secuenciación de amplicones 16S rRNA, los cambios en la diversidad bacteriana y la presencia de resistencia a oxitetraciclina, en muestras del proceso de vermicompostaje (excretas frescas, precompostadas y vermicompost de estas) del Módulo Lechero de la Sede del Atlántico de la Universidad de Costa Rica, además de los té de vermicompost con y sin melaza, utilizados como abonos líquidos. Las comunidades de estiércol fresco y precompostado estuvieron dominadas por bacterias de los filos Firmicutes y Bacteroidetes y compartieron una similitud de Bray-Curtis del 71%, aunque el precompostaje provocó una disminución de la abundancia de los géneros dominantes, incluidos coliformes. El vermicompostaje aumentó la diversidad del sustrato y provocó un marcado cambio en la comunidad bacteriana, dominada por bacterias fijadoras de nitrógeno y degradadoras de compuestos orgánicos complejos pertenecientes a las Proteobacterias y Bacteroidetes. El té de vermicompost mantuvo la comunidad central “core” del sustrato, sin embargo, la adición de melaza al té tuvo un fuerte impacto sobre la diversidad, favoreciendo la proliferación de géneros como *Acinetobacter* y *Aeromonas* (73% de las lecturas). A partir de todas las muestras anteriores se cultivaron bacterias en caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina, donde las excretas frescas tuvieron la mayor cantidad de ASVs resistentes (32), con géneros como *Acinetobacter* y *Bacteroides* en mayor abundancia. El período de precomposteo disminuyó los ASVs resistentes a 10, y el vermicompostaje a 5. La preparación de los té con o sin suplemento de melaza aumentó los ASVs resistentes (23 y 19, respectivamente), la mayoría compartidos con la muestra de excretas frescas. Dentro de los géneros compartidos se encuentran *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, y *Proteus* que tienen la capacidad de diseminar determinantes de resistencia, y, en el caso de *Aeromonas*, esta presente en alta abundancia en el té suplementado con melaza.

Este trabajo contribuye a una mejor comprensión de la presencia de bacterias resistentes de origen ambiental y su diversidad en diferentes agroecosistemas de nuestro país, y se espera que esta información sirva como insumo para la toma de decisiones con respecto al control en el uso de antibióticos en la producción agrícola y pecuaria en Costa Rica, de manera que ejerza un efecto positivo en el ambiente productivo, ambiental y de salud pública.

ABSTRACT

This study employed both culture-dependent and independent methods, including cultivation, high-throughput sequencing, and bioinformatic analysis, to explore bacterial community diversity in various agroecosystems of Costa Rica and during the vermicomposting tea production process. The investigation also focused on identifying bacteria resistant to commonly used antimicrobials in plant protection and bovine veterinary treatment.

A collection of 116 bacteria isolated from bacterial infections in 19 crops, including vegetables, fruit trees, and ornamentals in Costa Rica. The sequencing of the 16S rRNA gene and the semi-automated Biolog system revealed 55 species within 20 bacterial genera, with *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea*, and *Stenotrophomonas* being the most abundant. Approximately 27% of the isolates were categorized as pathogenic through the hypersensitivity reaction test, including phytopathogenic species like *Pseudomonas syringae*, *P. cichorii*, *Pantoea anthophila*, *P. stewartii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Dickeya oryzae*, *Erwinia billingiae*, *Pectobacterium aroidearum*, and *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. Under this study conditions, 60% of the bacteria isolated from 17 out of 19 crops were classified as resistant to at least one of the evaluated antibiotics. The highest MICs were observed in isolates from cabbage, tomato, banana, sweet pepper, celery, melon, turmeric, cauliflower, and heart of palm. Among the most abundant genera, the proportion of resistant isolates ranged from 86% (*Stenotrophomonas*) to 54% (*Pantoea*). Resistance to streptomycin was the most prevalent (35%), followed by tetracycline (28%) and gentamicin (9%). Additionally, the proportion of resistance in bacteria with positive hypersensitivity reactions was higher (74%) than in those considered non pathogenic (54%).

The study further analyzed changes in bacterial diversity and the presence of oxitetracycline resistance in samples from the vermicomposting process at the Dairy Module of the Atlantic Campus of the University of Costa Rica. This included fresh and precomposted manure, vermicompost, and vermicompost teas with and without cane molasses additive. Sequencing of 16S rRNA amplicons revealed that fresh and precomposted manure communities were dominated by Firmicutes and Bacteroidetes, sharing a Bray-Curtis similarity of 71%, although precomposting led to a reduction in the abundance of dominant genera, including coliforms. Vermicomposting increased substrate diversity, shifting the bacterial community towards nitrogen-fixing and complex organic compound-degrading bacteria in Proteobacteria and Bacteroidetes. Vermicompost tea retained the substrate's core community, but the addition of molasses strongly impacted diversity, favoring genera like *Acinetobacter* and *Aeromonas* (73% of reads). Bacteria cultivated in nutrient broth supplemented with 10 µg/ml oxitetracycline revealed that fresh manure had the highest number of resistant amplicon sequence variants (ASVs) (32), with higher abundance of genera such as *Acinetobacter* and *Bacteroides*. Precomposting reduced resistant ASVs to 10, while vermicomposting reduced them to 5. Tea preparation with or without molasses increased resistant ASVs (23 and 19, respectively), mostly shared with fresh manure. Shared genera included *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, and *Proteus*, known for disseminating resistance determinants, with *Aeromonas* present in high abundance in molasses-supplemented tea.

This research contributes to a better understanding of the presence of environmentally derived antibiotic-resistant bacteria and their diversity in different agroecosystems in our country. This information is expected to provide insights for informed decision-making regarding antibiotic control in Costa Rica's agricultural and livestock production, ultimately leading to a positive impact on productivity, the environment, and public health.

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro 1.1. Características de las muestras de 19 cultivos colectados entre el año 2006 y 2009 de las que proviene la colección bacteriana analizada.</i>	<i>13</i>
<i>Cuadro 1.2. Rango de CMIs detectados en bacterias clasificadas como resistentes a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y gentamicina según planta hospedera.</i>	<i>19</i>
<i>Cuadro 1.3 Géneros bacterianos identificados en la colección analizada y frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos estreptomicina (Estr), tetraciclina (Tet) y gentamicina (Gent).</i>	<i>20</i>
<i>Cuadro 2.1. Parámetros químicos y diversidad de las muestras relacionadas con el proceso de vermicompostaje.</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 2.2. Géneros (o último nivel taxonómico identificado) con abundancia relativa mayor al 2 % de secuencias detectadas en muestras de vermicompostaje.</i>	<i>45</i>
<i>Cuadro 2.4 Número e identificación a nivel de género de ASVs detectados en caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina cultivados a partir de muestras crudas del proceso de vermicompostaje.</i>	<i>53</i>
<i>Cuadro S1.1 Identificación de bacterias aisladas de plantas con síntomas de infección y sus características de fitopatogenicidad y resistencia a antibióticos.</i>	<i>81</i>
<i>Cuadro S2.1. Abundancia relativa de los Filos en las muestras del proceso de vermicompost.</i>	<i>86</i>
<i>Cuadro S2.2 Abundancia relativa de los ASVs identificados por análisis filogenético como especies con potencial patogénico clínico o animal en las muestras del proceso de vermicompost.</i>	<i>87</i>
<i>Cuadro S2.3 Datos de similitud y disimilitud entre las muestras del proceso de vermicompostaje determinados por el análisis de Porcentaje de Similitud (SIMPER).</i>	<i>89</i>
<i>Cuadro S2.4 Abundancia relativa de las Clases en las muestras del proceso de vermicompostaje.</i>	<i>90</i>
<i>Cuadro S2.5 Identificación de ASVs crecidos en caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina a partir de muestras del proceso de vermicompostaje.</i>	<i>93</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Fig. 1. Diagrama de flujo de entrada y salida de antimicrobianos (y bacterias resistentes) en agroecosistemas de Costa Rica.</i>	2
<i>Fig. 1.1. Cladograma construido con el método del vecino más cercano a partir de 70 secuencias parciales del gen ARNr 16S de bacterias aisladas de lesiones en plantas y secuencias de cepas de referencia.</i>	16
<i>Fig. 1.2. Tipos de Reacción hipersensible (RH) en los géneros más frecuentemente observados en muestras de vegetales con síntomas de infección bacteriana.</i>	17
<i>Fig. 1.3. Ejemplo de resultados observados en las pruebas de sensibilidad de antibióticos.</i>	18
<i>Fig. 1.4. Hospederos con aislamientos bacterianos resistentes (CMI \geq 12 μg/ml) a los antibióticos Streptomycin (Estr), Tetraciclina (Tet) y Gentamicina (Gent) y sus combinaciones.</i>	18
<i>Fig. 1.5. Proporción de cepas resistentes a los antibióticos estudiados de acuerdo a la escala de RH determinada por Herrera (2009).</i>	22
<i>Fig. 2.1 Diagrama de representación del proceso de vermicompostaje llevado a cabo en el Módulo Lechero de la Sede del Atlántico (UCR), y de los téis preparados con el mismo material.</i>	40
<i>Fig. 2.2 Abundancias de Filos (A) y Géneros (B) presentes en muestras del proceso de vermicompostaje de excretas bovinas.</i>	47
<i>Fig. 2.3 Gráfico de sombras que muestra las relaciones entre grupos de muestras y los 28 taxones más importantes, según los cálculos de Primer7.</i>	49
<i>Fig. 2.4 Abundancia de filos y diversidad de muestras de comunidades cultivables resistentes a oxitetraciclina obtenidas del proceso del vermicompostaje de excretas bovinas.</i>	51
<i>Fig. 2.5 Ordenación del escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basada en la matriz de distancia Bray-Curtis de comunidades cultivables resistentes a 10 μg/ml de oxitetraciclina del proceso de vermicompostaje.</i>	54

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos ha sido clasificada como una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo por la Organización Mundial de la Salud. A pesar de ser un fenómeno natural, diferentes factores han contribuido a la selección de bacterias resistentes y a la rapidez con la cual se presenta, tales como el consumo excesivo e inadecuado de antibióticos por parte de la población, la falta de control en su venta, y el abuso de los antibióticos en la producción agropecuaria, tanto en el control de enfermedades causadas por bacterias en animales y plantas como en forma de promotores de crecimiento para animales de granja (Haynes et al., 2020; Manyi-Loh et al., 2018; McManus et al., 2002; OMS, 2018; Wang et al., 2020).

En Costa Rica la resistencia a antibióticos es un problema importante, lo que ha llevado a la declaratoria de interés público y nacional del “Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos. Costa Rica 2018-2025” por parte del Gobierno de la República y el Ministerio de Salud. Este decreto reconoce el aumento en la frecuencia de infecciones en hospitales y comunidades causadas por bacterias resistentes, que obliga a utilizar tratamientos más novedosos, costosos y prolongados, con un impacto importante en el gasto en Salud del Estado costarricense (García, 2006; MSP, 2018). Además, recientemente, se presentó una iniciativa de un proyecto de ley en la Asamblea Legislativa para prohibir y controlar una lista de 16 plaguicidas peligrosos (prohibidos por diferentes agencias internacionales), en la cual se incluyeron los antibióticos gentamicina, tetraciclina, estreptomycinina y kasugamicina (Quiros, 2023).

Estudios realizados en nuestro país, han identificado determinantes genéticos de resistencia que son compartidos entre bacterias provenientes de humanos (flora intestinal, intrahospitalarias), de animales y ambientes agrícolas, implicando una diseminación de bacterias resistentes a antibióticos entre los diferentes ambientes y/o una transferencia horizontal (entre bacterias diferentes) de los genes de resistencia (De la Cruz et al., 2008; García, 2006; MSP, 2018; Rodríguez et al., 2006; Vindas, 2019).

Los antibióticos son ampliamente utilizados en el sector agrícola de nuestro país, en cultivos (hortalizas) para consumo humano, plantas ornamentales para exportación, y en el sector pecuario, como promotor de crecimiento en producción animal y para el tratamiento terapéutico y profiláctico de los animales (Blanco-Meneses et al., 2023; Carmona & Vindas, 2008; De la Cruz et al., 2008; García, 2006). Además, el consumidor nacional es poco exigente en la calidad de la presentación e inocuidad del producto (Galt, 2007; Stolker et al., 2013).

La entrada de los productos antimicrobianos y bacterias resistentes a los agroecosistemas costarricenses (Figura 1) ocurre por diferentes vías: Una es la aplicación de estos compuestos como

parte de la estrategia de manejo de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas, en la cual los residuos de estos antibióticos pueden permanecer en suelos y vegetales (Aust et al., 2008; Rodríguez et al., 2006). En el caso de las fincas lecheras, la entrada al sistema se debe a la medicación directa del bovino, a la aplicación de los antimicrobianos en el alimento cuando se trata de un problema general del hato, o por el acarreo de residuos de antimicrobianos utilizados por la fábrica de alimentos en otras fórmulas (Granados-Chinchilla et al., 2014; Haynes et al., 2020; Stolker et al., 2013). Otra posible entrada de estos residuos es en el agua de riego, cuando es tomada de ríos contaminados con aguas residuales domésticas y de hospitales (Haynes et al. 2020; Vindas, 2019). Por otro lado, las bacterias resistentes a antibióticos se pueden diseminar en la misma forma antes mencionada para los antimicrobianos, incluyendo las excretas del ganado tratado con antibióticos (Faissal et al., 2017; Smith et al., 2019), que son utilizadas como abono en forma directa en pastos para alimentación de ganado, o después de ser sometidas a un proceso de bio transformación como el compostaje y vermicompostaje y derivados (este estudio).

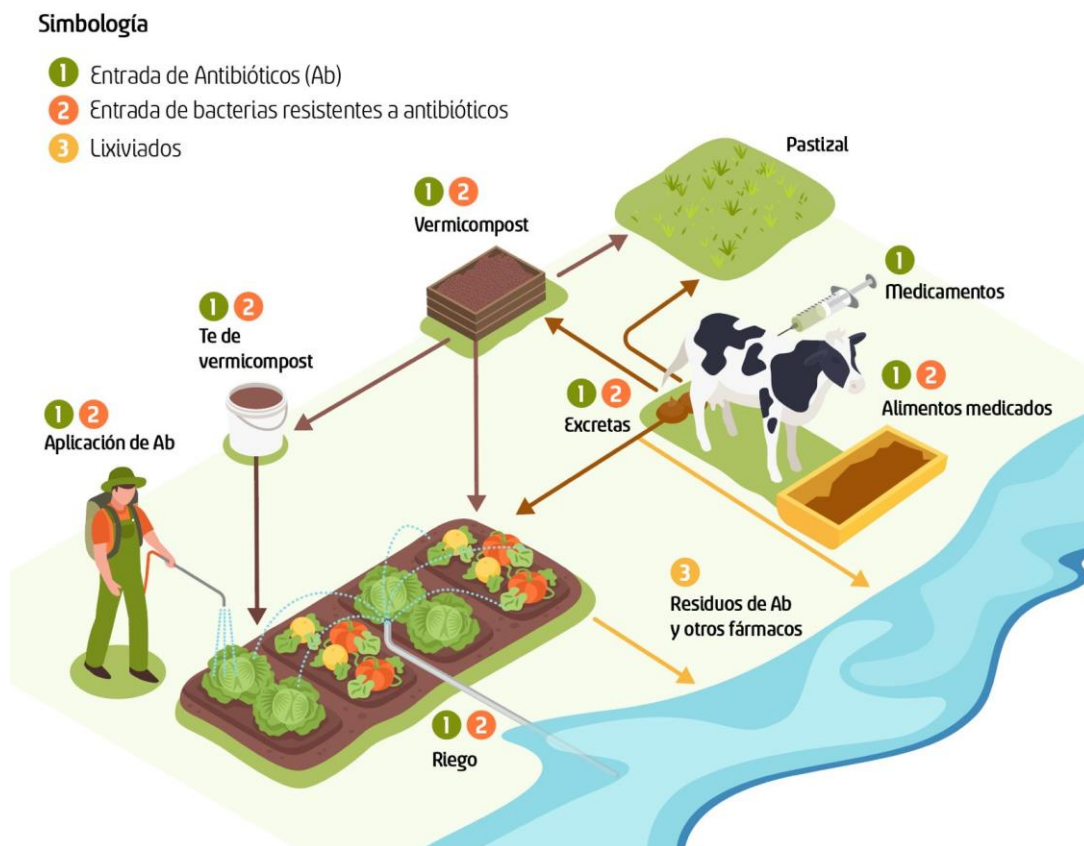


Fig. 1. Diagrama de flujo de entrada y salida de antimicrobianos (y bacterias resistentes) en agroecosistemas de Costa Rica.

La aplicación de excretas bovinas en el campo es una práctica comúnmente utilizada a nivel mundial para aumentar la fertilidad del suelo y la producción de alimentos (Smith et al., 2019; Zhao et al., 2022), a pesar de que estas prácticas pueden causar problemas ambientales y de salud pública (Virto et al., 2022). En Costa Rica las excretas se aplican de forma directa sin tratamiento previo, o después de someterlas a procesos como la preparación de fermentos microbianos (bioles), el compostaje, el vermicompostaje, y la elaboración de té de compost (Zamora et al., 2017). El vermicompostaje es un proceso utilizado para valorizar el exceso de excretas de las granjas lecheras y la diversidad de su microbioma contribuye a sus numerosas características benéficas (Pathma & Sakthivel, 2012). Si bien existe en el país información sobre comunidades microbianas presentes en el vermicompost (Durán & Henríquez, 2007; Zamora et al., 2017), las investigaciones realizadas se basaron en métodos dependientes de cultivo, cuyas limitaciones restringen el acceso a información detallada de la comunidad microbiana, en particular de las especies no cultivables. Se desconocen, además, los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas ocurridos durante el proceso de vermicompostaje, desde las excretas hasta la obtención de los productos derivados del vermicompost, y la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en los diferentes subproductos.

En este estudio se emplearon métodos dependientes de cultivo y secuenciación Sanger para la identificación molecular de una colección de bacterias aisladas de plantas con infección bacteriana, a fin de determinar la susceptibilidad a la gentamicina, estreptomycinina y tetraciclina, antibióticos utilizados en Costa Rica para el combate de enfermedades bacterianas. Adicionalmente se realizó secuenciación de alto rendimiento, análisis bioinformático y bioestadístico para determinar los cambios en la estructura de las comunidades bacterianas presentes en el estiércol de vaca, vermicompost y té de vermicompost (con y sin adición de melaza), además se realizó un análisis comparativo de estas poblaciones bacterianas y se determinó la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina, antibiótico utilizado en el tratamiento veterinario del ganado bovino.

Bibliografía

- Aust, M. O., Godlinski, F., Travis, G. R., Hao, X., McAllister, T. A. & Leinweber, P. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut.* 156, 1243–1251.
- Blanco-Meneses, M., Castro-Zúñiga, O., & Calderón-Abarca, A. (2023). Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 47(1), 87-99.
- Carmona, G. & Vindas, S. 2008. Uso racional de medicamentos veterinarios en ganado bovino. Disponible en: https://images.engormix.com/s_articles/carmonasolano_medicamentos.pdf

- De la Cruz, E., Fournier, M.L., García, F., Molina, A., Chavarría, G., Alfaro M., Ramírez, F., & Rodríguez, C. (2014). Hazard prioritization and risk characterization of antibiotics in an irrigated Costa Rican region used for intensive crop, livestock and aquaculture farming. *Journal of Environmental Biology*, 35: 85-98.
- Durán, L & Henríquez, C. (2007). Caracterización química, física y microbiológica de vermicompostes producidos a partir de cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense* 31(1):41-51.
- Faissal, A., Ouazzani, N., Parrado, J. R., Dary, M., Manyani, H., Morgado, B. R., ... & Mandi, L. (2017). Impact of fertilization by natural manure on the microbial quality of soil: Molecular approach. *Saudi journal of biological sciences*, 24(6), 1437-1443.
- Galt, RE. (2007). Regulatory risk and farmers' caution with pesticides in Costa Rica. *Trans. Inst. Br. Geogr.* 32: 377–394.
- García, F. (2006). “Diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos entre bacterias de origen humano, animal y agrícola: impacto en la Salud Pública y en el medio ambiente” Ciclo de Charlas: “Fortalecimiento de la Investigación en Salud Pública en Costa Rica”.
- Granados-Chinchilla, F., Alfaro, M., Chavarría, G., & Rodríguez, C. (2014). Unravelling a vicious circle: Animal feed marketed in Costa Rica contains irregular concentrations of tetracyclines and abundant oxytetracycline-resistant Gram-positive bacteria. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(6), 1017-1025.
- Haynes, E., Ramwell, C., Griffiths, T., Walker, D., & Smith, J. (2020). Review of antibiotic use in crops, associated risk of antimicrobial resistance and research gaps. Fera Science Ltd, 83.
- McManus, PS, Stockwell, VO, Sundin, GW, & Jones, AL. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40: 443–465.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., & Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 795.
- MSP (Ministerio de Salud Pública). (2018). Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos 2018-2025.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Pathma, J., & Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus*, 1(1), 1-19.

- Quiros, B. (2023, 8 de junio). Iniciativa prohibirá el uso de al menos 16 plaguicidas comunes en el país. *crhoy.com*. <https://www.crhoy.com/nacionales/iniciativa-prohibira-el-uso-de-al-menos-16-plaguicidas-comunes-en-el-pais/>
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5870-5876.
- Smith, S. D., Colgan, P., Yang, F., Rieke, E. L., Soupir, M. L., Moorman, T. B., ... & Howe, A. (2019). Investigating the dispersal of antibiotic resistance associated genes from manure application to soil and drainage waters in simulated agricultural farmland systems. *PLoS One*, 14(9), e0222470.
- Stolker, A. A. M., Manti, V., Zuidema, T., Van Egmond, H., Deckers, E. R., Herbes, R., ... & De Jong, J. (2013). Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(6), 1100-1107.
- Vindas, M. J. (2019). Espectro de resistencia, estructura genética y relaciones evolutivas de plásmidos conjugativos con resistencia a tetraciclinas aislados de ecosistemas agropecuarios costarricenses. [Tesis Maestría Académica en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., & Hernández, I. (2022). Antibiotics in Dairy Production: Where Is the Problem?. *Dairy*, 3(3), 541-564.
- Wang, F., Han, W., Chen, S., Dong, W., Qiao, M., Hu, C., & Liu, B. (2020). Fifteen-year application of manure and chemical fertilizers differently impacts soil ARGs and microbial community structure. *Frontiers in microbiology*, 11, 62.
- Zamora K., Castro L., Wang A., Arauz L.F. & Uribe L. (2017). Uso potencial de lixiviados y téis de vermicompost en el control del ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. *Agronomía Costarricense* 41(1): 33-51.
- Zhao, X., Shen, J. P., Shu, C. L., Jin, S. S., Di, H. J., Zhang, L. M., & He, J. Z. (2022). Attenuation of antibiotic resistance genes in livestock manure through vermicomposting via *Protoaetia brevitarsis* and its fate in a soil-vegetable system. *Science of The Total Environment*, 807, 150781.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la presencia, biodiversidad y dinámica poblacional de bacterias resistentes a antibióticos en diferentes agroecosistemas y productos agrícolas de Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la resistencia a los antibióticos estreptomicina, oxitetraciclina y gentamicina en una colección de bacterias aisladas de tejidos infectados de hortalizas colectados en tres zonas de alta producción de Costa Rica.
- II. Clasificar las bacterias resistentes e identificar representantes de cada grupo mediante secuenciación del gen que codifica por su ARN ribosomal 16S.
- III. Analizar la relación entre la presencia de resistencia en la planta hospedera y la localización geográfica.
- IV. Analizar la diversidad y cambios en la estructura de las comunidades bacterianas presentes en abonos orgánicos preparados a base de estiércol de vaca mediante secuenciación de alto rendimiento.
- V. Determinar la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en abonos orgánicos preparados a base de estiércol de vaca.

CAPÍTULO 1: Diversidad y susceptibilidad a antibióticos en bacterias aisladas de cultivos agrícolas de Costa Rica

1.1 Introducción

Las bacterias asociadas a plantas sobreviven como epífitas en su superficie o endófitas colonizando los haces vasculares (Agrios, 2005), y en la mayoría de los casos, realizan funciones que mantienen el balance del sistema como la fijación de nitrógeno, la nitrificación y el antagonismo contra bacterias y hongos fitopatógenos (Arauz, 2011; Compant et al., 2019; Hashem et al., 2019; Nion & Toyota, 2015). Por su parte, las bacterias fitopatógenas utilizan las plantas como fuente de nutrientes y se han especializado en evadir sus defensas e invadir los tejidos (Agrios, 2005). Si bien las bacterias epífitas, endófitas y fitopatógenas comparten nichos, solo las últimas provocan enfermedades (Kannan & Bastas, 2015; Vidaver & Lambrecht, 2004).

En términos generales, algunas cepas de las bacterias fitopatógenas pertenecientes a las familias Xanthomonadaceae, Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae pueden causar enfermedad a diversas especies de plantas (Kannan & Bastas, 2015) y la mayoría se clasifica en los géneros *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma* y *Phytoplasma* (Agrios, 2005; Ellis et al., 2008; Kannan & Bastas, 2015). Cabe destacar que la taxonomía de estas bacterias se encuentra en proceso de cambio. En Costa Rica, los principales géneros de bacterias que se han reportado como causantes de enfermedades en cultivos son *Xylella*, *Phytoplasma*, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Burkholderia*, *Clavibacter* y el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (Aguilar et al., 2005; Arauz, 2011; Brenes-Prendas et al., 2012; Cubero-Agüero et al., 2021; González & García, 2014; Jimenez & Fernandez, 1987; Lopez, 2021; Vargas-Fernández et al., 2022; Villalobos et al., 2002).

La infección bacteriana puede aparecer como manchas en flores o en frutos (Agrios, 2005; Arauz, 2011), o en el caso de las especies patogénicas de *Agrobacterium*, transformar genéticamente a sus hospederos provocando un crecimiento cancerígeno llamado agalla de la corona o la proliferación de raíces en cabellera (Agrios, 2005; Ellis et al., 2008).

Algunas especies de *Erwinia* y *Pseudomonas* colonizan los vasos del xilema causando marchitamiento. Por su parte, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris* producen áreas de necrosis que empiezan en el xilema pero que se extienden a los tejidos circundantes y se denominan cancos. Estas mismas bacterias hacen que los tejidos dañados produzcan exudados, en un proceso conocido como gomosis (Agrios, 2005; Höfte, 2007; Vidaver & Lambrecht, 2004). Además, los patógenos necrotróficos *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya dadanti*, *Pseudomonas viridiflava* y

P. fluorescens, causan pudrición blanda particularmente entre las plantas con tejido parenquimatoso carnoso. La patogénesis de esta enfermedad está primordialmente mediada por las enzimas pépticas poligalacturonasas y pectato liasas (Bellincampi et al., 2014; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014).

Esta variedad de síntomas y de hospederos hacen a las bacterias fitopatógenas responsables de graves daños a cultivos y, por ende, a la economía desarrollada a partir de la agricultura (Arauz, 2011). Unido a esto, las enfermedades de plantas causadas por bacterias son más graves y frecuentes en zonas tropicales y subtropicales, donde las condiciones de calor y humedad son ideales para el crecimiento bacteriano (Kannan & Bastas, 2015), y constituyen una limitación para la producción agropecuaria (Arauz, 2011; Stockwell & Duffy, 2012). Por lo tanto, el control de estos patógenos es vital para conservar la productividad de los agroecosistemas, sin embargo, pocas sustancias son eficaces o se encuentran disponibles para mitigar la pérdida de la cosecha (Stockwell & Duffy, 2012). En algunos países, especialmente en nuestra zona, la aplicación de antibióticos es aún el método más utilizado para el manejo de algunas enfermedades bacterianas.

Los antimicrobianos son sustancias químicas sintéticas o naturales derivadas de microorganismos, que inhiben o matan a otros microorganismos (Krause et al., 2016; Madigan et al., 2018) sin causar un mayor daño al hospedero (Mascaretti, 2003). Actúan en diferentes blancos en la célula bacteriana, ya sea desestabilizando la membrana citoplasmática, inhibiendo la síntesis de la pared celular o el metabolismo de los ácidos nucleicos e interfiriendo con los procesos de la síntesis de proteínas. Ejemplos de antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas incluyen aminoglicósidos y oxitetraciclinas (Madigan et al., 2018).

Después de su descubrimiento a partir de la década de 1940, se consideró su potencial para el control de bacterias fitopatógenas y, particularmente la estreptomycinina, fue utilizada para el combate de varias enfermedades de plantas en Estados Unidos (McManus et al., 2002; Agrios, 2005; Stockwell y Duffy, 2012). Sin embargo, el fracaso de la estreptomycinina en el control de infecciones por bacterias fitopatógenas fue detectado en campo tan solo 5 años después de su comercialización, lo que generó el uso de otros antibióticos como amikacina, tetraciclinas y el ácido oxolínico o gentamicina en algunos países (Stockwell y Duffy, 2012; Mann et al., 2021).

Actualmente, los antibióticos más utilizados en el control de enfermedades en plantas a nivel mundial son estreptomycinina, oxitetraciclina, penicilina, ácido oxonólico y gentamicina (McManus et al., 2002; Mann et al., 2021), este último solo en países asiáticos como China, y Vietnam, y Latinoamérica, incluyendo Costa Rica (MSP, 2018; Rodríguez et al., 2008; Sundin & Wang, 2018; Taylor & Reeder, 2020). No obstante, debido a su importancia para el uso médico, solamente la estreptomycinina y oxitetraciclina son aprobados para agricultura en Estados Unidos y algunos países de la Unión Europea (Miller et al., 2022). En el caso de países de medio y bajo ingreso, los datos

disponibles sobre la magnitud del uso de antibióticos y en qué cultivos y enfermedades son utilizados son muy limitados (Taylor & Reeder, 2020).

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos de amplio espectro, que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas (Madigan et al., 2018). Para su uso en el control de bacterias fitopatógenas, se formula como un complejo con calcio o como clorhidrato de oxitetraciclina (Mascaretti, 2003). Se utiliza en Estados Unidos para *Erwinia amylovora* en pera y *Xanthomonas arboricola* en nectarina y melocotón y desde el 2016 para el control del Huanglongbing en cítricos en Florida (Hu & Wang, 2016; McManus, et al., 2002). La estreptomycinina y la gentamicina son aminoglicósidos cuyo modo de acción se basa en la inhibición del proceso de traducción dentro de la subunidad ribosomal 30 en las bacterias (Krause et al., 2016; Mascaretti, 2003). La estreptomycinina es el antibiótico más utilizado para el control de enfermedades en plantas en todo el mundo, seguido por la oxitetraciclina (McManus, et al., 2002; Miller et al. 2022; Sundin y Wang 2018) y se utiliza contra un amplio rango de bacterias fitopatógenas causantes de manchas, quemaduras y pudriciones (Agrios, 2005; Stockwell & Duffy, 2012; Sundin, 2002).

Los antibióticos son utilizados con resultados variables en el control de enfermedades bacterianas en plantas (McManus et al., 2002; Stockwell & Duffy, 2012). La mayoría de las formulaciones son rociadas en la parte aérea, de manera que son absorbidas y translocadas sistémicamente en cantidades limitadas (Agrios, 2005; McManus et al., 2002). Por ejemplo, la absorción de oxitetraciclina en cítricos vía foliar es muy limitada, por lo que se debe recurrir a la inyección al tronco para el combate del Huanglongbing en este cultivo (Killiny et al., 2020). Sin embargo, aunque es posible detectar estas sustancias un mes después de su aplicación, se ha reportado que estos compuestos estuvieron activos en la superficie de la planta por menos de una semana (Stockwell & Duffy, 2012).

Por otro lado, existe preocupación por el uso de antibióticos en la agricultura por el potencial de propagación de la resistencia, ya que la estreptomycinina, tetraciclinas y gentamicina son antimicrobianos de importancia para la medicina humana, y por la aparición de nuevos patógenos oportunistas de origen ambiental no humano, especialmente entre ciertas especies o clones dentro de los Enterobacteriales, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Enterococcus* asociados con el uso de agentes antimicrobianos (Baquero et al., 2019; FAO, 2021; Silbergeld et al., 2008; Taylor & Reeder, 2020; WHO, 2019)

La resistencia a antibióticos es la capacidad natural o adquirida de un organismo para resistir los efectos de los agentes quimioterapéuticos a los que normalmente es susceptible y puede estar codificada a nivel cromosómico o en elementos genéticos que se replican independientemente del cromosoma (Madigan et al., 2018). Las poblaciones bacterianas susceptibles pueden adquirir

resistencia por mutaciones o por la transferencia horizontal de genes (THG) de resistencia a partir de bacterias cercanas o distantes taxonómicamente, siendo este el principal mecanismo de propagación de resistencia (Huddleston, 2014; Madigan et al., 2018; Mascaretti, 2003). Los elementos genéticos que participan en la THG son plásmidos conjugativos, transposones, bacteriófagos, integrones y casetes genéticos de resistencia (Cabrera et al., 2007; González et al., 2004; Huddleston, 2014). Los tres mecanismos más reconocidos de THG en procariontes son la conjugación, la transformación y la transducción. La transformación es la incorporación de ADN exógeno del medio ambiente, mientras que la transducción es una forma de transferencia de material genético entre bacterias que puede ocurrir cuando un bacteriófago infecta una bacteria, capturando parte de su ADN que luego transmite a otra bacteria cuando infecta nuevamente. La conjugación es el mecanismo más estudiado y consiste en la transferencia de plásmidos conjugativos a través de pilis sexuales, de la célula donante a la receptora (Huddleston, 2014; Soucy et al. 2015; van Elsas, 2003). Existen además otros mecanismos descritos como participantes en la transferencia de material genético entre bacterias, como los agentes de transferencia génica, la fusión celular y los nanotubos (Molina-Santiago & Bernal, 2023; Soucy et al. 2015).

En el campo agrícola, la selección de bacterias resistentes se ha atribuido al uso excesivo de antibióticos en la producción agropecuaria, ya sea en forma de promotores de crecimiento para animales de granja, productos veterinarios, y en menor grado, productos para el control de fitopatógenos (FAO, 2021; Mann et al., 2021; McManus et al., 2002). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la presencia de bacterias resistentes en alimentos vegetales y animales (Boehme et al., 2004; Granados-Chinchilla & Rodríguez, 2017; Hölzel et al., 2018; Rodríguez et al., 2006; Rodríguez et al., 2008; Silbergeld et al., 2008; Srichamnong et al., 2021).

La filósfera se considera uno de los puntos calientes de actividad de transferencia de genes en las bacterias asociadas a plantas, ya que se da un aumento del metabolismo y de la posibilidad de las células de agruparse y formar microcolonias o biopelículas que pueden favorecer la THG (van Elsas et al., 2003). De hecho, el consumo de productos alimentarios como las verduras de hojas crudas se reconoce como una de las principales vías de difusión del resistoma (Scaccia, et al., 2021). Además, la exposición de productores y trabajadores de granjas a bacterias resistentes es también de gran preocupación, ya que puede trasladarse a las comunidades en riesgo, especialmente por el contacto persona a persona (Silbergeld et al., 2008), o por contaminación de los cuerpos de agua, el suelo y el aire (Kraemer et al., 2019). Es por las razones anteriores que la OMS considera al uso de antibióticos en el sector agropecuario un problema de salud pública, y en unión con la FAO desarrolla una estrategia global para la contención de la resistencia a los antibióticos, como la publicación del Plan de Acción sobre la Resistencia a Antibióticos que comprende los años 2021-2025 (FAO, 2021).

En Costa Rica existen diferentes productos registrados en el Servicio Fitosanitario del Estado que se adquieren en comercios dedicados a la venta de insumos agropecuarios y para los que no se requiere receta ni recomendación de un regente (Blanco-Meneses et al., 2023; Galt, 2007; Galt, 2009; MSP, 2018; Rodríguez et al., 2006). Los principales antibióticos utilizados en estos productos en diferentes formulaciones son oxitetraciclina (Terramicina Agrícola 5 WP, Clorhidrato de Oxitetraciclina), y mezclas de oxitetraciclina con estreptomina en Agri-mycin® 16.5 WP (1.5 % de oxitetraciclina y 15 % de estreptomina) y Agri-mycin® 44.3 WP (0.17 % de oxitetraciclina, 1.75 % de estreptomina y 42.2 % de sulfato tribásico de cobre). La gentamicina se comercializa como Agri-gent Plus 8WP® (2 % sulfato de gentamicina, 6 % clorhidrato de oxitetraciclina). Otro antibacteriano utilizado en el control de infecciones en plantas es el aminoglicosido kasugamicina (Kasumin® 2 SL) (MSP, 2018).

La importación de antibióticos en los últimos años ha sido variable, desde 90.3 ton en el 2017 hasta 33.8 ton en el año 2021 (Procomer, 2022), no obstante, en el país no existe un sistema de registro integrado que facilite un control eficaz de su utilización en humanos, vegetales y animales (MSP, 2018). De la Cruz et al., (2008) determinaron que el consumo de antibióticos en el cultivo de melón, sandía y arroz en el Distrito de riego Arenal-Tempisque fue de 7.4-155.0 g/ha año tanto para estreptomina como oxitetraciclina. Un estudio reciente que reporta el uso de antibióticos por productores de tomate de 5 áreas de producción del país encontró que el 71,8 % los utilizan para el control de enfermedades que consideran de origen bacteriano, aunque en dosis diferentes a las que se recomiendan en la ficha técnica del producto, y en aplicaciones que van desde 1 a 2 veces por semana (54.3 % de los productores) hasta cada 15 o 30 días (Blanco-Meneses et al., 2023). Sin embargo, no hay más estimaciones del uso en otros cultivos ni en otras zonas de producción en el país.

Desde el año 2002 existe preocupación a nivel internacional sobre el uso de la gentamicina por agricultores en Centroamérica, Chile y México, ya que cualquier residuo innecesario en el alimento podría comprometer su uso en infecciones en seres humanos, por lo que no se debería emplear en los productos vegetales comestibles (Vidaver, 2002). Actualmente, la preocupación por el uso de antibióticos en la agricultura debido al potencial de propagación de la resistencia a bacterias de importancia médica, se extiende, además de la gentamicina, a la estreptomina y la oxitetraciclina, ya que fueron incluidos en la lista de antimicrobianos de importancia crítica para la medicina humana por la OMS, al ser unos de los pocos tratamientos disponibles para la endocarditis enterocócica, la tuberculosis y las enterobacteriaceas multirresistentes (estreptomina y gentamicina), y para las infecciones por *Brucella* spp., *Chlamydia* spp. y *Rickettsia* spp. (tetraciclinas) (FAO, 2021; Silbergeld et al., 2008; Taylor & Reeder, 2020; WHO, 2019).

El uso de gentamicina fue reportado en el año 2007 en la provincia de Cartago por productores de vegetales de exportación a pesar de estar prohibida para su uso en Estados Unidos, utilizándola además sin respetar el período de carencia o intervalo sin aplicación pre cosecha establecido por la Agencia de Protección Ambiental de ese país, tendencia observada en agricultores de países en desarrollo (Galt, 2007). Además, el uso de bactericidas estuvo entre los más empleados por productores de papa en Pacayas entre los años 2006 y 2009 (Ramírez-Muñoz et al., 2014), periodo que coincide con el establecimiento de la colección bacteriana analizada en este estudio.

Estudios realizados en Costa Rica identificaron bacterias epífitas resistentes a gentamicina y oxitetraciclina en muestras de lechuga, así como determinantes genéticos de resistencia compartidos entre bacterias provenientes de humanos (flora intestinal e intrahospitalaria), de animales y ambientes agrícolas, lo que implica una diseminación de bacterias resistentes a antibióticos entre los diferentes ambientes y/o una transferencia horizontal de genes de resistencia (García, 2006; Rodríguez et al., 2006; 2008; Vindas, 2019).

En el presente estudio, se analizó una colección de bacterias que, al aislarse a partir de lesiones en hojas, tallo y fruto, provenientes de cultivos con síntomas de infección bacteriana (necrosis, manchas y pudrición blanda), se favoreció que estuviera compuesta de bacterias patógenas de plantas, bacterias oportunistas y habitantes comunes del filoplano, incluyendo endófitos. El objetivo de este capítulo fue determinar la diversidad de bacterias fitopatógenas en diferentes cultivos de Costa Rica y evaluar su resistencia a los antibióticos estreptomycin, oxitetraciclina y gentamicina, utilizados para el control de enfermedades bacterianas de plantas en este país.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Aislamientos bacterianos

Se analizaron 116 bacterias Gram-negativas pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM-UCR), aisladas a partir de lesiones indicativas de infección bacteriana. Las muestras fueron recolectadas entre el año 2006 al 2009 durante la estación lluviosa, en fincas de las provincias de Cartago, Alajuela, Heredia y Limón, y también fueron analizadas muestras llevadas por agricultores al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos para su identificación. Los síntomas más comunes fueron pudrición blanda, manchas foliares y de frutos, quema de la hoja y marchitamiento. En el Cuadro 1.1 se presenta información pertinente respecto a cultivo, tipo de tejido, síntoma observado y sitio de colecta.

Cuadro 1.1. Características de las muestras de 19 cultivos colectados entre el año 2006 y 2009 de las que proviene la colección bacteriana analizada.

Planta hospedera	Nombre científico	N° de muestras	Tejido infectado	Síntomas observados	Provincia	N°
Apio	<i>Apium graveolens</i>	3	Tallo	Pudrición blanda	Cartago	6
Palmito	<i>Bactris gasipaes</i>	3	Hoja	Necrosis	Limon	6
Coliflor	<i>Brassica oleracea</i> var. botrytis	2	Hoja	Mancha	Heredia	5
Repollo	<i>Brassica oleracea</i> var. capitata	6	Hoja	Necrosis angular, Mancha, Pudrición blanda	Heredia, Cartago	25
Chile dulce	<i>Capsicum annuum</i>	2	Fruto	Pudrición blanda	Cartago	9
Melón	<i>Cucumis melo</i>	1	Fruto	Pudrición blanda	Guanacaste	5
Zapallo	<i>Cucurbita pepo</i>	1	Fruto	Pudrición blanda	Cartago	3
Cúrcuma	<i>Curcuma longa</i>	2	Raíz	Pudrición blanda	Guanacaste	4
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	1	Raíz	Pudrición blanda	Alajuela	1
Dracaena	<i>Dracaena massangeana</i>	2	Tallo	Pudrición blanda	Alajuela	7
Higo	<i>Ficus carica</i>	1	Hoja	Mancha	Alajuela	1
Lechuga Boston	<i>Lactuca sativa</i>	2	Hoja	Mancha	Cartago	5
Lechuga Iceberg	<i>Lactuca sativa</i> var. capitata	6	Tallo, Hoja	Pudrición blanda, Mancha	Cartago	11
Mango	<i>Mangifera indica</i>	2	Fruto	Mancha	Alajuela	4
Banano	<i>Musa paradisiaca</i>	5	Tallo, Corona	Pudrición blanda, Necrosis del tallo	Limon	12
Ornamental	<i>Ornithogalum arabicum</i>	1	Hoja	Pudrición blanda	Alajuela	2
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2	Hoja	Mancha	Heredia	3
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	3	Fruto, Hoja	Manchas del fruto y hoja, Pudrición blanda de fruto	Alajuela, Cartago	6
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	1	Raíz	Pudrición blanda	Cartago	1
TOTAL		46				116

Los aislamientos obtenidos fueron purificados y sometidos a pruebas bioquímicas preliminares utilizando claves de identificación desarrolladas para bacterias fitopatógenas (Braun-Kiewnick & Sands, 2001; DeBoer et al., 2001), para posteriormente comprobar su identificación utilizando el sistema semiautomatizado Biolog™. La fitopatogenicidad de las bacterias pertenecientes a la colección fue previamente evaluada por medio de la reacción hipersensible (RH) y una prueba de pectinólisis en rodajas de papa (Herrera, 2009; Robayo, 2008). La RH se realiza mediante la inoculación de las bacterias en el envés de hojas de *Nicotiana tabacum*, con el fin de provocar su reconocimiento por parte de la planta y que, si la bacteria es patógena, la planta restrinja su avance mediante apoptosis de las células circundantes al sitio de entrada (Camagna & Takemoto, 2018), los síntomas se presentan como clorosis y necrosis delimitada por los haces vasculares o nervaduras (Bellincampi et al., 2014).

1.2.2 Determinación del perfil de susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad a los antibióticos estreptomicina, gentamicina y tetraciclina mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (García et al., 2000) utilizando discos que contenían tetraciclina (30 ug), gentamicina (10 ug) o estreptomicina (10 ug) de la casa comercial Oxoid (Fig. 1.3 A). Debido a que los cortes para la interpretación de la prueba se realizan con especies bacterianas de origen clínico humano y no existen directrices para la determinación de la susceptibilidad para bacterias ambientales, se utilizaron los siguientes puntos de corte únicos arbitrarios basados en las recomendaciones para patógenos humanos de las mismas familias taxonómicas para clasificar la colección: Resistente a Tetraciclina (halo ≤ 14 mm), intermedio (15-18 mm), sensible (≥ 19 mm). Gentamicina (halo ≤ 12 mm), intermedio (13-14 mm), sensible (mayor o igual a 15 mm). Estreptomicina (halo ≤ 11 mm), intermedio (entre 12-14 mm), sensible (≥ 15 mm), que corresponden a los cortes para *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. y enterobacterias (NCCLS, 2000). Se utilizaron como controles las cepas *E. coli* ATCC-25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-15442 donadas por la Facultad de Microbiología.

1.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

A los aislamientos categorizados como resistentes e intermedios por la prueba anterior se les determinó la CMI de estreptomicina, gentamicina y oxitetraciclina con tiras E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia). El E-test permite determinar cuantitativamente la resistencia a antibióticos, ya que contiene un gradiente de antibiótico predefinido que indica el valor de la CMI. Se realizó esta prueba siguiendo el protocolo reportado por Lang & García (2004), utilizando como medio de cultivo agar LB e incubando a una temperatura de 30°C. Después del periodo de incubación se documentó el resultado de las concentraciones mínimas (Fig. 1.3 B y C, Cuadro 1S1). Para efectos de este estudio, se consideró resistentes los aislamientos clasificados como resistentes o intermedios por la prueba de Kirby-Bauer, que presentaron una CMI ≥ 12 $\mu\text{g/ml}$ (Miernik & Rzeczycka, 2007; Rodríguez et al., 2008). El uso de esta concentración se basó en la recomendación para patógenos humanos entéricos, no entéricos y anaerobios según la guía CLSI (2017), ya que es superior a la concentración mínima inhibitoria intermedia para estos grupos bacterianos.

1.2.4 Identificación molecular de la colección de bacterias mediante análisis del gen ARN 16S ribosomal

Se extrajo el ADN de biomasa contenida en 3ml de caldo nutritivo incubado por 24-48 horas a 30°C, siguiendo el protocolo de extracción reportado por Fontecha (2003). Posteriormente se realizó la amplificación del gen ARNr 16S utilizando imprimadores universales: 27F

(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Weisburg et al., 1991). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en 50 μ L con 200 μ M de cada dNTPs (Thermo Scientific), 1,25 mM de MgCl₂ (Thermo Scientific), 0,4 μ M de cada imprimador, 0,5 U de Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific), buffer con KCl y sin MgCl₂ 1X (Thermo Scientific), y ~10 ng de ADN genómico. Se amplificaron las reacciones con el programa y condiciones reportadas por Fontecha (2003), y fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1 %.

Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante y fueron secuenciados en un equipo ABI PRISM 3130 con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied BioSystems) o, alternativamente, externamente en la compañía Macrogen (Corea). Las secuencias resultantes fueron ensambladas utilizando el software BioEdit Sequence Alignment Editor Versión 7.2 (Hall, 1999). La búsqueda de homología se realizó utilizando la base de datos BLASTN del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para encontrar similitudes con secuencias depositadas en el GenBank (Altschul et al., 1997), y utilizando una extensión de EzbioCloud (Yoon et al., 2017) que almacena secuencias del gen del ARNr 16S de cepas tipo de nombres válidamente publicados.

El análisis filogenético fue construido utilizando las secuencias que superaron los 1000 pb con calidad óptima. Las secuencias se alinearon utilizando ClustalX (Larkin et al., 2007) en el programa MEGA (Tamura et al., 2013), y se realizó un análisis filogenético con secuencias de cepas tipo de referencia y *Bacillus subtilis* (NR112116) como grupo externo. Las distancias evolutivas se calcularon mediante la inferencia de Neighbour joining y se evaluó la topología del árbol realizando 1000 remuestreos. El árbol fue visualizado utilizando la herramienta ITOL (<https://itol.embl.de.com>). Las secuencias obtenidas se depositaron en la base de datos GenBank del NCBI bajo el bioproyecto PRJNA898399.

1.3 Resultados

1.3.1 Identificación de bacterias aisladas de lesiones en plantas

En la Cuadro S1.1 se detalla la información del hospedero, fitopatogenicidad e identificación fenotípica y molecular de los 116 aislamientos utilizados en este estudio, así como el resultado del análisis de resistencia. Se logró obtener 90 secuencias con la calidad necesaria para su identificación molecular (Fig. 1.1), y los 26 aislamientos restantes se identificaron utilizando el Sistema Biolog™, que cuenta con una base de datos con 626 bacterias Gram-negativas aerobias, entre ellas especies de origen ambiental y las especies fitopatógenas más comunes. Las relaciones filogenéticas y presencia

Los aislamientos del género *Pseudomonas* se obtuvieron a partir de la mayoría de los cultivos analizados, con la excepción de las muestras de higo, palmito y papa, y no se les encontró únicamente en muestras de la zona de Cot de Cartago. Los aislamientos del género *Serratia* se recuperaron a partir de muestras de apio, banano, chile dulce, coliflor, cúrcuma, lechuga criolla, repollo y tomate, de las provincias de Cartago, Limón, Heredia y Guanacaste, mientras que los del género *Pantoea* fueron obtenidos de diversos cultivos como chile dulce, lechuga americana y criolla, repollo, palmito y dracaena, también en las mismas provincias. Los aislamientos de *Stenotrophomonas*, siguiente género en abundancia de la colección, se encontraron en palmito, coliflor, repollo y lechuga en las provincias de Cartago, Limón y Heredia (Cuadro S1.1).

Al clasificar la colección de aislamientos de acuerdo a el resultado de la prueba de RH, se encontró que el 73 % no se clasifica como patógeno de plantas si se toman en consideración los niveles 3, 4 y 5 de RH en la escala de fitopatogenicidad determinada por Herrera (2008). En el caso de los géneros bacterianos de mayor abundancia, se observó una mayor proporción de aislamientos con fitopatogenicidad dentro del género *Stenotrophomonas* (57.2 %) y *Pantoea* (45.5 %), seguido por *Pseudomonas* (21.4 %), *Psychrobacter* (16.7 %) y *Serratia* (7.1 %) (Fig. 1.2).

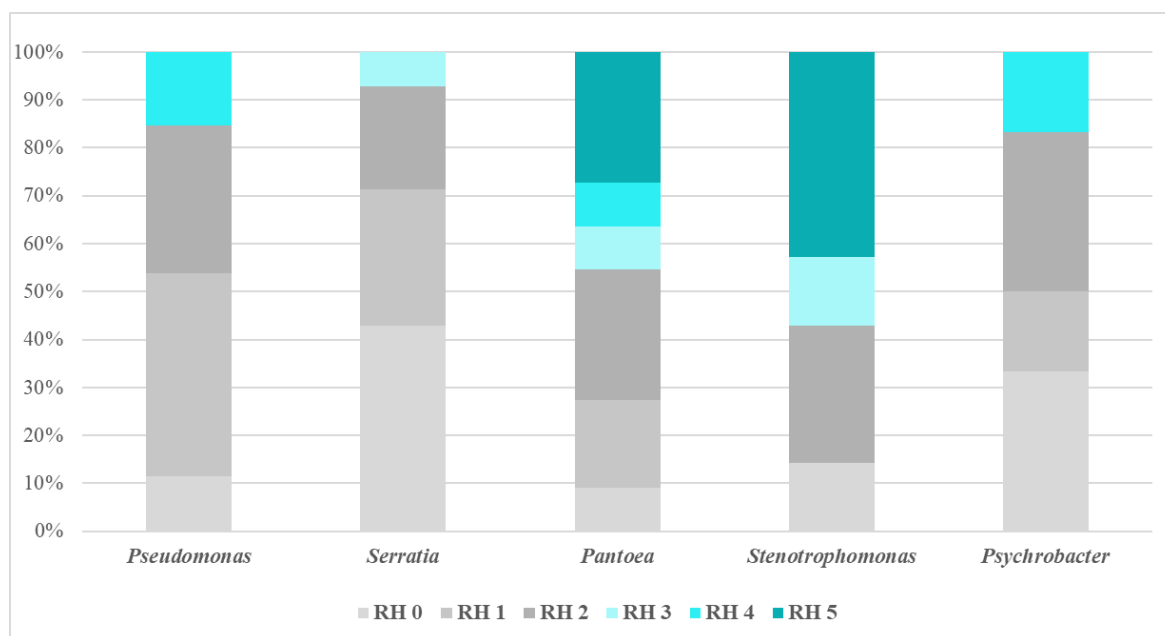


Fig. 1.2. Tipos de Reacción hipersensible (RH) en los géneros más frecuentemente observados en muestras de vegetales con síntomas de infección bacteriana.

Se considera bacteria fitopatógena los aislamientos con RH entre 3 y 5 inclusive. Los niveles de RH de 0 a 2 indican no patogenicidad.

1.3.2 Perfil de susceptibilidad a los antibióticos estreptomycinina, tetraciclina y gentamicina.

De acuerdo con los cortes arbitrarios utilizados en la interpretación de la prueba de susceptibilidad por el método de difusión en agar y la CMI de $\geq 12 \mu\text{g/ml}$ en conjunto, se observó la presencia de bacterias en esta clasificación en todas las muestras de plantas analizadas con excepción de mango y papa (Figura 1.3, Cuadro 1.2).

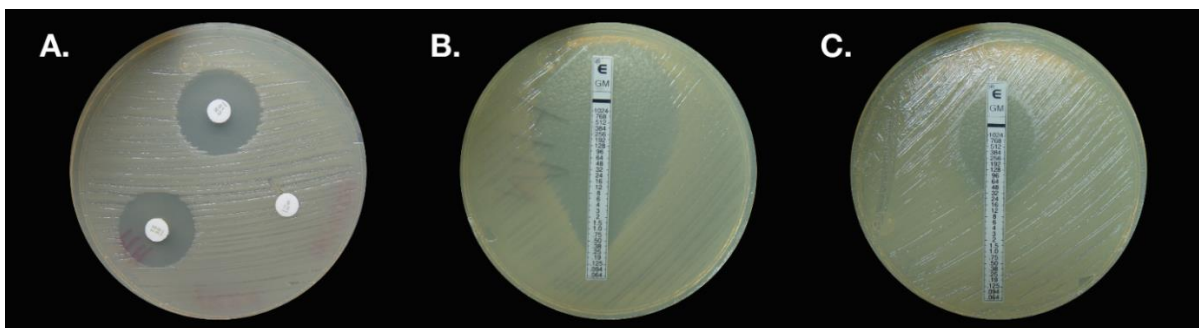


Fig. 1.3. Ejemplo de resultados observados en las pruebas de sensibilidad de antibióticos. A. Halos de inhibición de crecimiento causados por los antibióticos gentamicina y tetraciclina impregnados en discos (Oxoid), y ausencia de halo alrededor de disco de estreptomycinina, que se atribuye a la resistencia a este. B. Bacteria con una CMI de $0.25 \mu\text{g/ml}$ para gentamicina, determinada por el método de E-test. C. Bacteria con una CMI de $32 \mu\text{g/ml}$ para el mismo antibiótico.

Las muestras de repollo (cultivo con un mayor número de aislamientos) mostraron la mayor cantidad de aislamientos que fueron considerados resistentes, incluyendo un fenotipo de resistencia doble (estreptomycinina-gentamicina) (Cuadro 1.2, Fig. 1.4). Como se puede observar en la Fig. 1.4, aislamientos bacterianos obtenidos de banano y chile dulce también presentaron los mismos fenotipos de resistencia que los aislamientos de repollo, excepto que se observó resistencia a Estreptomycinina-Tetraciclina (Estr-Tet). En el caso del palmito, cuyas muestras provienen de un mismo sitio (Guápiles, Limón), se aisló la mayor cantidad de bacterias con resistencia múltiple. Otro cultivo que presentó bacterias resistentes a los tres antibióticos analizados fue la lechuga Iceberg, cuyas muestras provienen de diferentes fincas de la provincia de Cartago.

De manera general, la resistencia a estreptomycinina fue el fenotipo común entre las diferentes muestras excepto en el caso del higo. Para este antibiótico, todos los aislamientos provenientes de tomate y cúrcuma tuvieron una CMI máxima de $>1024 \mu\text{g/ml}$, los de apio una CMI de 128 a $>1024 \mu\text{g/ml}$ y en el caso de repollo, banano, melón y coliflor, de 12 a $>1024 \mu\text{g/ml}$, chile dulce de 16 a $>1024 \mu\text{g/ml}$ y lechuga americana de 12 a $96 \mu\text{g/ml}$. Los demás cultivos presentaron bacterias con CMI entre 12 y $48 \mu\text{g/ml}$ (Cuadro 1.2, Cuadro S1.1).

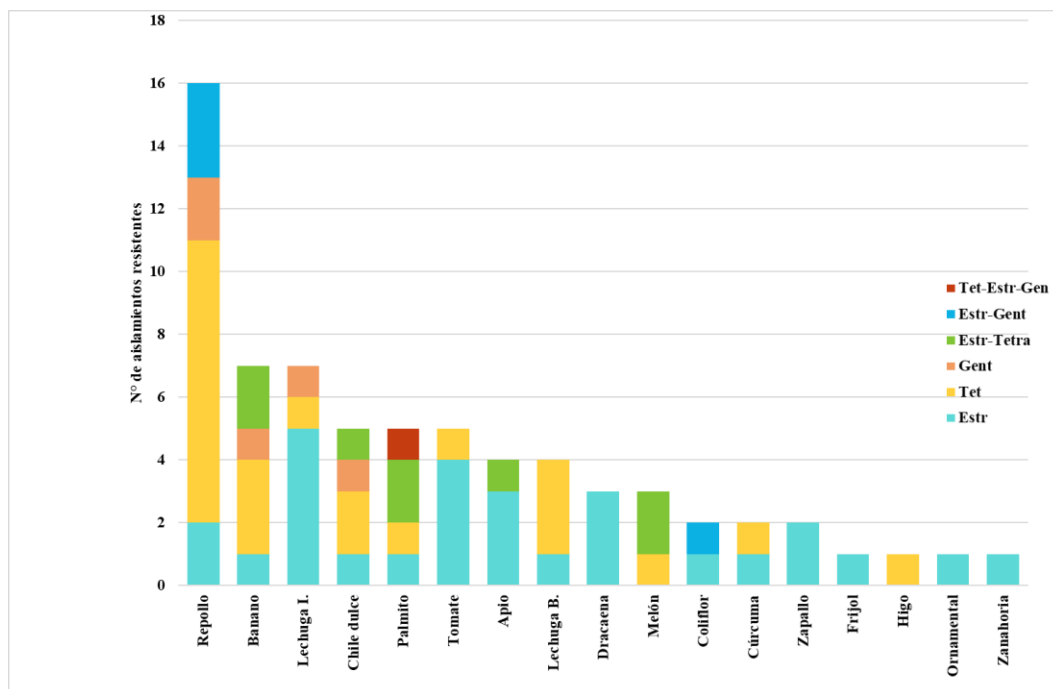


Fig. 1.4. Hospederos con aislamientos bacterianos resistentes ($\text{CMI} \geq 12 \mu\text{g/ml}$) a los antibióticos Estreptomicina (Estr), Tetraciclina (Tet) y Gentamicina (Gent) y sus combinaciones.

Cuadro 1.2. Rango de CMIs detectados en bacterias clasificadas como resistentes a los antibióticos estreptomicina, tetraciclina y gentamicina según planta hospedera.

Hospedero	N° aislamientos	Estreptomicina		Tetraciclina		Gentamicina	
		N° resistentes	CMIs (ug/ml)	N° resistentes	CMIs (ug/ml)	N° resistentes	CMIs (ug/ml)
Repollo	25	5	12 a >1024	9	12 a >256	5	16 a >256
Banano	12	3	12 a >1024	4	12 a >256	1	12
Chile dulce	9	2	16 a >256	3	>256	1	12
Lechuga Iceberg	11	5	12 a 96	1	24	1	48
Palmito	6	4	12	4	12 a 24	1	>256
Tomate	6	4	>1024	1	>256	0	
Coliflor	5	2	12 a >1024	0		1	32
Apio	6	5	128 a >1024	1	24	0	
Lechuga Boston	5	1	32	3	128 a >256	0	
Melón	5	2	12 a >1024	3	12	0	
Cúrcuma	4	1	>1024	1	12	0	
Dracaena	7	3	12 a 48	0		0	
Zapallo	3	2	16 a 48	0		0	
Frijol	3	1	24	0		0	
Ornamental	2	1	24	0		0	
Higo	1	1	96	0		0	
Zanahoria	1	0		1	32	1	
Mango	4	0		0		0	
Papa	1	0		0		0	

En el caso de la tetraciclina, aislamientos de repollo, banano, chile dulce, lechuga criolla y zanahoria tuvieron CMI máxima de >256. A pesar de encontrarse con menor frecuencia, los aislamientos resistentes a gentamicina tuvieron CMI máxima de >256 en el palmito, 16 a >256 en el repollo y de 12 a 48 en banano, chile dulce y coliflor (Cuadro 1.2, Cuadro S1.1).

Dentro de los géneros que tuvieron una mayor cantidad de aislamientos resistentes (Cuadro 1.3), se encuentran *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea* y *Stenotrophomonas*, todas con miembros fitopatógenos y saprófitos caracterizados por su identificación molecular y la reacción hipersensible (Fig.1.1, Cuadro S1.1).

Cuadro 1.3 Géneros bacterianos identificados en la colección analizada y frecuencia de bacterias resistentes a los antibióticos estreptomycin (Estr), tetraciclina (Tet) y gentamicina (Gent).

Filo	Clase	Género	Nº	Aislamientos con CMI (E-test) ≥ 12 ug/ml						Resistentes Nº (%)
				Estr	Tet	Gent	Estr- Tet	Estr- Gent	Estr- Tet- Gent	
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	56	17	8	1	3	1	0	30 (53.6 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Serratia</i>	14	1	6	0	2	1	0	10 (71.4 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pantoea</i>	11	2	1	1	1	0	0	5 (45.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	7	1	2	1	1	0	1	6 (85.7 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Psychrobacter</i>	6	1	1	0	0	0	0	2 (33.3 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	4	0	1	0	0	1	0	2 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Raoultella</i>	2	1	1	0	0	0	0	2 (100.0 %)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	2	0	0	0	1	0	0	1 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Klebsiella</i>	2	1	0	0	0	0	0	1 (50.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Enterobacter</i>	2	0	1	0	0	0	0	1 (50.0 %)
Proteobacteria	Alfaproteobacteria	<i>Ochrobactrum</i>	1	0	1	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	1	0	0	1	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Betaproteobacteria	<i>Comamonas</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Dickeya</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100.0 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Escherichia</i>	1	0	0	1	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Pectobacterium</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Providencia</i>	1	1	0	0	0	0	0	1 (100 %)
Bacteroidetes	Sphingobacteriia	<i>Sphingobacterium</i>	1	0	0	0	0	1	0	1 (100 %)
Firmicutes	Bacilli	<i>Carnobacterium</i>	1	0	1	0	0	0	0	1 (100 %)
Proteobacteria	Gamaproteobacteria	<i>Erwinia</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL			116	28	23	5	8	4	1	69

El género *Pseudomonas* presentó un total de 56 aislamientos, de las cuáles 30 tuvieron una CMI mayor a 12 µg/ml (Cuadro 1.3, Cuadro S1.1) y se encontraron en todos los cultivos en los que se aisló este género. Se observaron cinco de los seis fenotipos de resistencia estudiados, siendo la resistencia a estreptomycin el fenotipo predominante. La resistencia a estreptomycin se detectó en un rango de 12 a >1024 µg/ml, con un 65 % de los aislamientos presentando CMIs mayores a 32 µg/ml. Cuatro de las cepas resistentes a este antibiótico mostraron los niveles máximos de CMI. En lo que respecta a la resistencia a tetraciclina, tres de las once cepas resistentes presentaron más de 256 µg/ml de CMI. Solamente 2 bacterias tuvieron resistencia a gentamicina (CMI de 12 a 24 µg/ml).

El género *Serratia*, mostró resistencia en 10 de las 14 cepas estudiadas (Cuadro 1.3, Cuadro S1.1). Se aislaron cepas resistentes en 6 de los 8 cultivos de los que se aislaron miembros de este género (repollo, tomate, chile, lechuga criolla, apio, y banano). La resistencia más comúnmente observada fue para tetraciclina, donde ocho de las 10 bacterias resistentes presentaron una CMI de >256 µg/ml para este antibiótico. Se encontraron también 3 cepas resistentes a estreptomycin (CMI de 12 a 512 µg/ml) y una a gentamicina (16 µg/ml).

Bacterias clasificadas como *Stenotrophomonas* mostraron CMI de 12 a >1024 µg/ml a estreptomycin, entre 12 y 24 a tetraciclina, y de 48 a >256 µg/ml a gentamicina, con solamente un aislamiento (MA-110) susceptible a todos los antibióticos, mientras que las especies de mayor patogenicidad presentaron resistencia variable, incluyendo el aislamiento MA-54 de palmito, único en el que se observó resistencia a los tres antibióticos. No obstante, otros aislamientos de este género clasificados como saprófitos también presentaron resistencia a un antibiótico, en su mayoría tetraciclina, con el aislamiento MA-142 de coliflor con el nivel más alto de resistencia a estreptomycin (Cuadro 1.3, Cuadro S1.1.)

1.3.3 Relación Fitopatogenicidad (RH)-Resistencia

Al comparar la calificación del grado de fitopatogenicidad con el número de cepas resistentes identificadas en cada categoría de reacción hipersensible (Fig. 1.5), se encontró que el 45 % de esta población saprófita, presentó resistencia a alguno de los antibióticos estudiados, aunque la proporción fue menor a la encontrada en los aislamientos patógenos (HR de 3, 4 y 5), en los que las bacterias resistentes representaron un 70 a un 83 %, correspondientes al nivel 5 y 3, respectivamente. Resistencia a alguno de los tres antibióticos fueron detectadas en todos los niveles de RH, y una bacteria con RH 5 (*Stenotrophomonas malthophilia* MA-54), fue la única en la que se detectó resistencia a los tres antibióticos. En el nivel de mayor patogenicidad se detectó mayor proporción de bacterias con resistencia múltiple. En la Cuadro S1.1 se detalla la información del hospedero, sitio de

colecta, fitopatogenicidad e identificación fenotípica y molecular de los 116 aislamientos utilizados en este estudio, así como el resultado del análisis de resistencia.

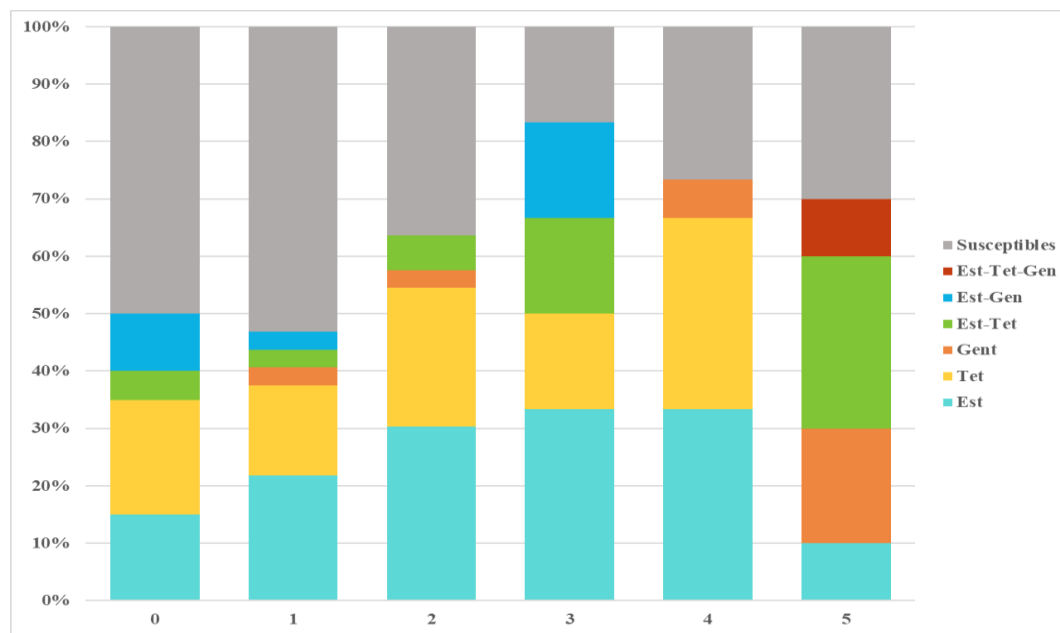


Fig 1.5. Proporción de cepas resistentes a los antibióticos estudiados de acuerdo a la escala de RH determinada por Herrera (2009).

En el eje Y se indica el porcentaje de aislamientos susceptibles dentro de cada categoría.

1.4 Discusión

La parte aérea de las plantas está colonizada por una comunidad bacteriana diversa, tanto en forma de epífitas en la superficie de la planta como de endófitos en el tejido vegetal. Mientras que algunas bacterias asociadas a las plantas promueven su crecimiento, otras pueden ser patógenas de plantas o inclusive de humanos (Jackson et al., 2013; Lindow & Brandl, 2003). Al respecto Jackson et al., (2013), al analizar la composición de la comunidad bacteriana de hortalizas de hoja verde mediante pirosecuenciación, identificó once filos diferentes, donde las Gamaproteobacterias, las Betaproteobacterias y los Bacteroidetes fueron los linajes dominantes. Estos filos coinciden con lo observado en este estudio, en el cual se encontraron los mismos grupos de Proteobacterias, además de Alfaproteobacterias, a pesar de que en nuestro caso se usaron técnicas dependientes de cultivo.

De los géneros identificados, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter* son bacterias Gram negativas que tienen representantes patógenos de plantas, sin embargo, estas bacterias son ubicuas en la naturaleza por lo que su presencia puede ser en calidad de

saprófitas o endófitas. Es importante recordar que estos aislamientos provienen de la zona del borde de la lesión y que debido al proceso de aislamiento en el cual la muestra es desinfectada con hipoclorito antes de la disección, pueden aislarse además endófitos que sobrevivan las condiciones de cultivo y bacterias oportunistas presentes en la superficie de las plantas durante la infección por fitopatógenos.

Serratia marcescens es una especie bacteriana diversa ecológica y genéticamente, que pertenece a la familia Yersiniaceae. Los miembros de esta especie sobreviven como saprofitas en el agua o el suelo, como rizobacterias, patógenos de insectos, endófitos de plantas y patógenos humanos oportunistas (Besler & Little, 2017). Este organismo posee gran capacidad para sobrevivir en el ambiente, miembros de esta especie pueden causar infecciones nosocomiales tanto en medicina humana como veterinaria (Grimont & Grimont 2006; Sykes, 2013). Además, la enfermedad de la vid amarilla de las cucurbitáceas (CYVD) es causada por cepas de *Serratia marcescens* que tienen fenotipos diferentes a los de las cepas no fitopatógenas (Zhang et al., 2005), y un aislamiento de esta especie se encontró como el agente causal de pudrición blanda en frutos de chile (Gillis et al., 2017). En este estudio se identificaron 14 aislamientos de esta especie, con alta similitud a la secuencia de la cepa tipo *Serratia marcescens* ATCC 13 880^T en diferentes hospederos incluso chile dulce, que a pesar de que su RH fue de baja a media, algunos aislamientos presentaron una alta actividad pectinolítica en papa (datos no mostrados), por lo que su papel en la planta hospedera debe estudiarse con un mayor detalle. Esta especie presentó el segundo número más alto de aislamientos con CMI \geq 12 $\mu\text{g/ml}$, y su nivel de resistencia fue el máximo para tetraciclina, y en un amplio rango para estreptomycinina, con solo un aislamiento resistente a gentamicina, lo que concuerda con un estudio realizado en Costa Rica donde se cultivaron aislamientos del género *Serratia* de suelos aplicados con gentamicina y tetraciclina, y estos aislamientos fueron resistentes a tetraciclina y sensibles a gentamicina (Rodríguez et al., 2007). A pesar de que *Serratia marcescens* presenta resistencia natural a los aminoglicósidos (Sandner-Miranda et al., 2018), la mayoría de los aislamientos analizados en este estudio fueron susceptibles a estreptomycinina, y la mitad de las cepas presentaron CMI altas, por lo que se hace necesario un mayor estudio de sus determinantes de resistencia.

Dentro del género *Pantoea* se encuentran bacterias fitopatógenas, endofíticas y epifíticas en una gran variedad de cultivos (Doni et al., 2021). Especies patógenas de plantas se han identificado *P. citrea*, *P. stewartii*, *P. ananas* y *P. agglomerans* pvs. *milletiae*, *gypsophilae* y *betae* y *P. vagans* identificada también en este estudio (Brady et al., 2008; Schaad et al., 2001). Su presencia en hortalizas como lechuga, chile dulce y repollo además de ornamentales demuestra su ubicuidad en plantas. *Pantoea stewartii* sp. indologenes MA-65, bacteria aislada de lesiones de hoja en palmito, es el agente causal de la bacteriosis del palmito que afectó plantaciones de este cultivo durante la década

del 2000 (Mora-Urpí et al., 2008). Esta bacteria es transmitida por insectos y coloniza el xilema de la planta donde se multiplica y produce exopolisacáridos que bloquean el flujo de agua y provocan marchitamiento (Koutsoudis et al., 2006). En este estudio, los aislamientos clasificados como patógenos por análisis filogenético y de fitopatogenicidad fueron los que presentaron resistencia a estreptomicina y tetraciclina. Los patógenos de plantas tienen una mayor persistencia en el filoplano que las bacterias saprófitas por lo que existe mayor oportunidad de contacto con los productos aplicados de manera foliar (Stockwell & Duffy, 2012).

Stenotrophomonas maltophilia y *S. rhizophila*, son bacterias Gram negativas, con metabolismo aeróbico y no fermentadora de la glucosa, asociadas con plantas, incluso con un estilo de vida endofítico, que se utilizan como agentes de biocontrol o de protección contra el estrés en la agricultura sostenible. Desde el punto de vista clínico *S. maltophilia* se clasifica como un patógeno oportunista emergente de origen ambiental, multirresistente, al que se ha reportado resistencia natural a aminoglicosidos en cepas de origen clínico, aunque en baja medida a la gentamicina (Antón et al., 2005; Berg & Martínez, 2015; Livermore et al., 2001). Se ha encontrado niveles altos de resistencia a tetraciclina y estreptomicina en aislamientos de estas especies en suelos sembrados con diferentes vegetales sometidos a presión de antibióticos (Popowska et al., 2012). Rodríguez et al. (2007), estudiando aislamientos identificados como provenientes de plantas de lechuga colectadas en fincas de Costa Rica, encontró que los aislamientos de *Stenotrophomonas* sp. fueron resistentes a la mayoría de los antimicrobianos probados incluyendo tetraciclina y gentamicina. En nuestro estudio, solamente uno de los siete aislamientos del género fue susceptible, sin embargo, las CMI estuvieron entre 12-24 µg/ml para tetraciclina y estreptomicina, con excepción de MA-142 que tuvo CMI máxima para estreptomicina y tuvieron un mayor nivel de resistencia a gentamicina. Entre los aislamientos resistentes se encuentran algunos recuperados a partir de palmito, que habían presentado un alto nivel de patogenicidad (Cuadro S1.1), adicionalmente, el aislamiento MA-54 fue el único de la colección resistente a los tres antibióticos estudiados (Cuadro 1.2). Es importante realizar un análisis detallado en los aislamientos de origen ambiental clasificados por *S. maltophilia* en la presencia de genes de resistencia asociados a elementos móviles en el caso de la estreptomicina y tetraciclina.

Pseudomonas es una Gamaproteobacteria aerobia, Gram-negativa, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae que contiene alrededor de 191 especies identificadas. Las diversas especies de *Pseudomonas*, debido a su versatilidad metabólica y plasticidad genética, son omnipresentes en el ecosistema del suelo. Son habitantes comunes de la rizosfera de las plantas, en las que desempeñan un papel importante en la promoción del crecimiento, el rendimiento del cultivo y la gestión de las enfermedades (Kumar et al., 2017). Esta diversidad de especies y capacidad metabólica puede ser la causa de que en nuestro estudio fuese aislada a partir de casi todas las muestras. La especie que ocupa

el lugar número uno en la lista de Mansfield et al., (2012) de las diez principales especies bacterianas patógenas de plantas, es *P. syringae*, con más de 50 patovares descritos (Höfte & De Vos, 2007). *P. syringae* fue identificada en este estudio en la muestra de frijol, junto con los patógenos *P. cichorii* y *P. orizihabitans*, patógenos de lechuga y melón respectivamente (Li et al., 2021; Wright & Lacy, 1988). A pesar de que la resistencia natural a los aminoglicosidos ha sido reportada en *P. aeruginosa* (Krahn et al., 2012), especie no identificada en este estudio, se encontró un amplio rango de CMI para estreptomicina, con más de la mitad de los aislamientos con CMI de media a máxima para estreptomicina y la mayoría susceptible a gentamicina. Debido a la ubicuidad de este género en diferentes ambientes y su utilización como biofertilizante y biocontrolador, es importante estudiar si los genes que confieren resistencia están presentes en el cromosoma o en determinantes de transferencia horizontal de genes, en aislamientos en este género y otros identificados en el estudio, tomando en cuenta que la mayoría de las *Pseudomonas* no fueron clasificadas como fitopatógenas.

La gran mayoría de las bacterias fitopatógenas identificadas filogenéticamente y mediante la prueba de Reacción Hipersensible previamente (Herrera, 2009), no han sido descritas en Costa Rica, y estos datos de fitopatogenicidad basados en la RH se utilizaron para confirmar el carácter fitopatógeno de las especies mencionadas (Agrios, 2015; Arauz, 2011). Como ejemplo de esto, los aislamientos de esta colección *Erwinia billingiae* MA-115 y *Raoultella terrigena*, fueron sometidos a pruebas de patogenicidad en plantas de mango y chile dulce respectivamente (cultivos de los que fueron aislados), y al comprobarse su virulencia por medio de la prueba de los Postulados de Koch, fueron descritos como fitopatógenos (Cubero et al., 2021; Vidaurre-Barahona et al., 2021).

Si bien los patrones de resistencia observados en bacterias deben describirse como la suma de la resistencia natural característica de la especie, más las resistencias adquiridas (Navarro et al., 2010), en esta colección de aislamientos de taxonomía diversa, existió una mayor proporción de bacterias resistentes según los criterios utilizados en aquellas mayor fitopatogenicidad, lo que puede estar relacionado con la adaptación de los patógenos a la sobrevivencia en el filoplano y en el apoplasto, donde pueden estar en mayor contacto con las aplicaciones foliares de antimicrobianos (Stockwell & Duffy, 2012). Por otro lado, es importante además estudiar en más detalle la presencia de aislamientos no patógenos como los clasificados como *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Ochrobactrum*, ya que estos géneros tienen representantes que son habitantes de suelos, aguas, peces y plantas, y constituyen potenciales reservorios de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos en entornos naturales, además de que algunas especies son potenciales patógenos para seres humanos (Adewoyin & Okoh, 2018; Grilo et al., 2020; Jäckel et al., 2017).

El hallazgo de resistencia a alguno de los antibióticos estudiados en el 60 % de los aislamientos podría reflejar la utilización de productos antimicrobianos que contienen estreptomicina, tetraciclina,

gentamicina, ya que estas bacterias fueron aisladas de cultivos sometidos a aplicaciones con esos productos. En este estudio se ha utilizado el umbral de 10 µg/ml como criterio para seleccionar bacterias resistentes de origen ambiental, a pesar de que este valor es mayor que la CMI de bacterias susceptibles pero menor que la de bacterias patógenas resistentes en entornos clínicos. Este enfoque se ha aplicado en estudios realizados en diferentes entornos, considerando que los microorganismos de origen ambiental están expuestos a concentraciones mucho menores que las bacterias clínicas, y aun así, generan resistencia en el entorno natural (Nogrado et al., 2021; Popowska et al., 2012; Sandegren, 2014).

La presencia de bacterias resistentes en el 90 % de los hospederos analizados, que constituyen un conjunto diverso de plantas, entre hortalizas, frutales y ornamentales, levanta la preocupación por el estado actual de resistencia a esos antibióticos. Los cultivos con mayor cantidad de bacterias resistentes y de fenotipos de resistencia de los tres antibióticos analizados fueron el repollo, banano, lechuga americana, palmito y chile dulce, lo que puede indicar un manejo más agresivo (en el tiempo en que fueron colectadas las muestras), a las enfermedades bacterianas que se presentaron en estos cultivos, como lo es la mancha angular en repollo causada por *Xanthomonas campestris* var. *campestris*, el marchitamiento causado por el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* en banano, las manchas foliares causadas por especies de *Pseudomonas* en lechuga, la bacteriosis que afectó cultivos de palmito en la década del 2 000, o la pudrición blanda que afecta a hortalizas, común en climas tropicales (Agrios, 2005; Bhat et al., 2010). Cabe resaltar que la mayoría de estas enfermedades continúan afectando cultivos en la actualidad.

La resistencia a los antibióticos es reconocida como una de las mayores amenazas para la salud pública mundial y la seguridad alimentaria debido al uso excesivo de estos compuestos en distintas actividades antropogénicas. Los resultados de este estudio respaldan la observación de la contribución de la producción de cultivos a la generación de resistencia (FAO, 2021). La mayor proporción de bacterias fitopatógenas resistentes es un fenómeno que debe estudiarse con más detalle por sus implicaciones tanto en el control de las enfermedades en cultivos, como en la salud pública. Entre los antibióticos de mayor uso en los cultivos desde hace décadas en Costa Rica, se encuentran productos con compuestos activos como tetraciclina, estreptomycin y gentamicina (MSP, 2018; Rodríguez 2008) en mezclas de estreptomycin y tetraciclina (Agri-mycin 16.5 WP y Agri-mycin 44.3 WP que además tiene sulfato de cobre), y también mezcla de tetraciclina y gentamicina (Agri-gent plus 8WP). El uso de estos productos por los agricultores no es regulado y dicha falta de regulación y de registros de aplicación no permite conocer su uso real, sin embargo, se ha estimado que el consumo de tetraciclina y gentamicina para la aplicación en cultivos podría superar las cantidades empleadas en medicina humana por un factor de 200 o 700, respectivamente (Rodríguez 2008).

Estos resultados pueden servir de base para el estudio de la evolución de la resistencia a antimicrobianos en bacterias patógenas y saprófitas de vegetales de consumo humano, debido al uso continuo e indiscriminado de estos aún en la actualidad. La información generada puede ser utilizada para promover en autoridades competentes la regulación en la venta y uso de los productos antimicrobianos, y el establecimiento de un intervalo precosecha estricto con el fin de mitigar tanto el efecto de estas sustancias en el ambiente, animales y en seres humanos.

1.5. Bibliografía

- Adewoyin, M. A., & Okoh, A. I. (2018). The natural environment as a reservoir of pathogenic and non-pathogenic Acinetobacter species. *Reviews on environmental health*, 33(3), 265-272.
- Agrios, GN. (2005). Plant pathology. 5 ed. Burlington, USA. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Aguiar, E., Villalobos, W., Moreira, L., Rodríguez, C. M., Kitajima, E. W., & Rivera, C. (2005). First report of *Xylella fastidiosa* infecting citrus in Costa Rica. *Plant disease*, 89(6), 687-687.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389-3402.
- Antón, D., Araque, Y., De Donato, M., Medina, B., & Marcano, M. (2005). Caracterización fenotípica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*. *Kasmera*, 33(2), 109-118.
- Arauz L. 2011. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Segunda edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 519 p.
- Baquero, F., Coque, T. M., Martínez, J. L., Aracil-Gisbert, S., & Lanza, V. F. (2019). Gene transmission in the one health microbiosphere and the channels of antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 10, 2892.
- Bellincampi, D; Cervone, F; & Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions (en línea). *Frontiers in Plant Science*, 5.
- Berg, G., & Martinez, J. L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? *Frontiers in microbiology*, 6, 241.
- Besler, K. R., & Little, E. L. (2017). Diversity of *Serratia marcescens* strains associated with cucurbit yellow vine disease in Georgia. *Plant disease*, 101(1), 129-136.
- Boehme, S., Werner, G., Klare, I., Reissbrodt, R. & Witte, W. (2004). Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48: 522-531.

- Bhat, K. A., Masoodi, S. D., Bhat, N. A., Ahmad, M., Zargar, M. Y., Mir, S. A., & Bhat, M. A. (2010). Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) caused by *Erwinia carotovora* sub sp. *carotovora*. *Journal of Phytology*, 2(2).
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., & Coutinho, T. (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31(6-8), 447-460.
- Brady, C. L., Venter, S. N., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Vancanneyt, M., Swings, J., & Coutinho, T. A. (2009). *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov. and *Pantoea anthophila* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(9), 2339-2345.
- Braun-Kiewnick, A., & Sands, D. C. (2001). *Pseudomonas*. En NW Shaad, J. B. Jones, W. Chun eds. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota. APS.
- Brenes-Prendas, S., Wang-Wong, A., & Agüero-Alvarado, R. (2012). Fitopatógenos asociados a *Dieffenbachia oerstedii* y *Syngonium podophyllum* en plantaciones de banano en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 23(1), 201-206.
- Brunel, B., Givaudan, A., Lanois, A., Akhurst, R. & Boemare, N. (1996). Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 63(2), 574-580.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia médica*, 38(2), 149-158.
- De Boer, S.H, Coplin, D.L, & Jones, A.L. (2001). *Erwinia* and *Pantoea*. En NW Shaad, JB Jones & W Chun eds. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, Minnesota. ety. p. 36.
- Camagna, M., & Takemoto, D. (2018). Hypersensitive response in plants. *eLS*, 1-7.
- CLSI (2017). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Seven Informational Supplement. M100-S27*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.

- Cubero-Agüero, D., Brenes-Guillén, L., Vidaurre-Barahona, D., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Raoultella terrigena* y *Pectobacterium carotovorum* en hortalizas en dos provincias de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 178-195.
- De la Cruz, E., Fournier, M.L., García, F., Molina, A., Chavarría, G., Alfaro M., Ramírez, F., & Rodríguez, C. (2014). Hazard prioritization and risk characterization of antibiotics in an irrigated Costa Rican region used for intensive crop, livestock and aquaculture farming. *Journal of Environmental Biology*, 35: 85-98.
- Doni, F., Suhaimi, N. S. M., Irawan, B., Mohamed, Z., & Mispan, M. S. (2021). Associations of *Pantoea* with rice plants: As friends or foes?. *Agriculture*, 11(12), 1278.
- Ellis, S. D., Boehm, M. J., & Coplin, D. (2008). Bacterial diseases of plants. *Agriculture and Natural Resources*, 2008, 401-406.
- FAO, (2021). El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2021-2025. Roma.
- Fontecha, G. A. (2003). Análisis comparativo de las comunidades de procariotas intestinales de *Rothschildia lebeau* (Lepidoptera) mediante los polimorfismos en los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP) del gen ARNr 16S. [Tesis Maestría Académica en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Galt, R. E. (2007). Regulatory risk and farmers' caution with pesticides in Costa Rica. *Trans. Inst. Br. Geogr.* 32: 377–394.
- Galt, R. E. (2009). “It just goes to kill Ticos”: National market regulation and the political ecology of farmers' pesticide use in Costa Rica. *Journal of Political Ecology*, 16: 1-33.
- Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. A. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editor Picazo J J.
- García, F. (2006). “Diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos entre bacterias de origen humano, animal y agrícola: impacto en la Salud Pública y en el medio ambiente” Ciclo de Charlas: “Fortalecimiento de la Investigación en Salud Pública en Costa Rica”.
- Gillis, A., Santana, MA., Rodríguez, M., & Romay, G. (2017). First Report of Bell Pepper Soft-Rot Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela. *Plant Disease*, 101(9):1671-1671.
- Granados-Chinchilla, F., & Rodríguez, C. (2017). Tetracyclines in food and feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017.

- Grimont, F; & Grimont, P. A. (2006). The genus *Serratia*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*: 219-244.
- Quesada-González, A., & García-Santamaría, F. (2014). *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 371-381.
- González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., & Domínguez, M. (2004). Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista médica de Chile*, 132(5), 619-626.
- Grilo, M. L., Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Oliveira, M. (2020). The potential of *Aeromonas* spp. from wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic environments. *Ecological Indicators*, 115, 106396.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41: 95-98.
- Hashem, A., Tabassum, B., & Fathi, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal Biological Sciences*, 26(6): 1291–1297 p.
- Herrera, K. (2009). Caracterización de la fitopatogenicidad de bacterias gram negativas aisladas de infecciones en plantas, mediante análisis fenotípico de la reacción de hipersensibilidad en *Nicotiana tabacum* y la detección molecular del gen efector hrpZ. [Tesis de Licenciatura en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Höfte, M., & De Vos, P. (2007). Plant pathogenic *Pseudomonas* species. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht.
- Hölzel, C. S., Tetens, J. L., & Schwaiger, K. (2018). Unraveling the role of vegetables in spreading antimicrobial-resistant bacteria: a need for quantitative risk assessment. *Foodborne pathogens and disease*, 15(11), 671-688.
- Hu, J., & Wang, N. (2016). Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against citrus Huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology*, 106(12), 1495-1503.
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infection and drug resistance*, 7, 167.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., & Shevchik, V. E. (2014). Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental Microbiology Reports* 6(5):427-440.
- Jackson, C. R., Randolph, K. C., Osborn, S. L., & Tyler, H. L. (2013). Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. *BMC microbiology*, 13(1), 1-12.

- Jäckel, C., Hertwig, S., Scholz, H. C., Nöckler, K., Reetz, J., & Hammerl, J. A. (2017). Prevalence, host range, and comparative genomic analysis of temperate *Ochrobactrum* phages. *Frontiers in microbiology*, 8, 1207.
- Jimenez, L. G., & Fernandez, B. (1987). Distribución, incidencia y comparación fenotípica de cepas de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causante del raquitismo del retoño de la caña de azúcar en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 11(1), 103-108.
- Kannan, V. R., & Bastas, K. K. (Eds.). (2015). Sustainable approaches to controlling plant pathogenic bacteria. CRC press.
- Killiny, N., Hijaz, F., Gonzalez-Blanco, P., Jones, S. E., Pierre, M. O., & Vincent, C. I. (2020). Effect of adjuvants on oxytetracycline uptake upon foliar application in citrus. *Antibiotics*, 9(10), 677.
- Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A., ... & Pandey, K. D. (2017). Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. In *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture* (pp. 195-215). Springer, Singapore.
- Koutsoudis, M. D., Tsaltas, D., Minogue, T. D., & von Bodman, S. B. (2006). Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5983-5988.
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- Krahn, T., Gilmour, C., Tilak, J., Fraud, S., Kerr, N., Lau, C. H. F., & Poole, K. (2012). Determinants of intrinsic aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 5591-5602.
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029.
- Lang, L., & García, F. (2004). Comparison of E-test and disk diffusion assay to evaluate resistance of *Helicobacter pylori* isolates to amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline in Costa Rica. *International journal of antimicrobial agents*, 24: 572-577.
- Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., et al., (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947-55.
- Li, J., Zhou, G. H., Wang, T., Lin, T., Wang, Y. W., Zhu, P. K., ... & Ma, G. (2021). First report of *Pseudomonas oryzihabitans* causing stem and leaf rot on muskmelon in China. *Plant Disease*, 105(9), 2713.

- Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875-1883.
- Livermore, D. M., Winstanley, T. G., & Shannon, K. P. (2001). Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl_1), 87-102.
- Lopez, L. M. (2021). Informe final. Evaluación de cultivares de tomate (*Solanum lycopersicum*) a la tolerancia de tres cepas de *Ralstonia solanacearum* bajo condiciones de invernadero. Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica.
- McManus, PS, Stockwell, VO, Sundin, GW, & Jones, AL. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual review of phytopathology*, 40: 443-465.
- McManus, P., & Stockwell, V. (2000). Antibiotics for plant diseases control: silver bullets or rusty sabers. APSnet Features. <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/AntibioticsForPlants.aspx>
- Madigan, MT, Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). Brock Biology of Microorganisms. 15th ed New York. Pearson. 1022 p.
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100030.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., ... & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629.
- Mascaretti, O.A. (2003). Bacteria versus Antibacterial Agents. ASM Press. Washington, DC, USA. 97-105, 115, 159-160, 229-234.
- Méndez, G. (2010). Caracterización fenotípica y genotípica de potenciales fitopatógenos bacterianos resistentes a la estreptomycin aislados en fincas costarricenses. [Tesis de Licenciatura en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Miernik, A. N. T. O. N. I., & Rzeczycka, M. (2007). The influence of selected antibiotics on aquatic microorganisms. *Polish Journal of Microbiology*, 56(4), 265.
- Molina-Santiago, C., & Bernal, P. (2023). Nanotube-mediated plasmid transfer as a natural alternative for the improvement of industrially relevant bacteria. *Microbial Biotechnology*, 16(4), 706.

- Mora-Urpí, J., Arroyo-Oquendo, C., Mexzón-Vargas, R., & Bogantes-Arias, A. (2008). Diseminación de la "Bacteriosis del palmito" de pejíbaye (*Bactris gasipaes* Kunth). *Agronomía mesoamericana*, 19(2), 155-166.
- MSP (Ministerio de Salud Pública). (2018). Plan de acción nacional de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos 2018-2025. s.p.
- Navarro, F., Miró, E., & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 28(9), 638-645.
- NCCLS. (National Committee of Clinical Laboratory Standard). (2000). Performance standard for antimicrobial disk susceptibility test, 7th Edition. Approved Standard Documents M2. National Committee of Clinical Laboratory Standard. Wayne. PA. USA.
- Nion, Y. A., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and environments*, ME14144
- Nogradio, K., Unno, T., Hur, H. G., & Lee, J. H. (2021). Tetracycline-resistant bacteria and ribosomal protection protein genes in soils from selected agricultural fields and livestock farms. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 1-9.
- Popowska, M., Rzczycka, M., Miernik, A., Krawczyk-Balska, A., Walsh, F., & Duffy, B. (2012). Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(3), 1434-1443.
- Pfeilmeier, S., Caly, D. L., & Malone, J. G. (2016). Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1298-1313.
- Prescott L., Harley J., Klein D. (2004). Microbiología. Quinta edición. McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. 145-162p.
- Procomer. (2022). Manual de Balanza de Pagos VI (consultado en línea en agosto del 2022).
- Ramírez-Muñoz F., Fournier-Leiva M.L., Ruepert C., & Hidalgo-Ardón C. (2014). Uso de agroquímicos en el cultivo de papa en Pacayas, Cartago, Costa Rica. *Agronomía mesoamericana*, 25(2): 337-345.
- Robayo, A. (2008). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias Gram-negativas aisladas de lesiones causadas por fitopatógenos en cultivos de Costa Rica. [Tesis de Licenciatura en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, C., Lang, L., Wang, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2006). Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 72: 5870–5876.

- Rodríguez, C., Wachlin, A., Altendorf, K., García, F., & Lipski, A. (2007). Diversity and antimicrobial susceptibility of oxytetracycline-resistant isolates of *Stenotrophomonas sp.* and *Serratia sp.* associated with Costa Rican crops. *Journal of applied microbiology*, *103*(6), 2550-2560.
- Rodríguez, C. R. (2008). Oxytetracycline and Gentamicin: Two clinically relevant antimicrobials widely used by Costa Rican farmers. Implications of Their Use Outside Clinical Settings and Request for Action. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, *2*(2), 64-71.
- Rodríguez, C., Altendorf, K., García, F., Smalla, K., & Lipski A. (2008). Spraying of oxytetracycline and gentamicin onto field-grown coriander did not affect the abundance of resistant bacteria, resistance genes, and broad host range plasmids detected in tropical soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, *44*: 589–596.
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., & Morales-Espinosa, R. (2018). The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 828.
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala journal of medical sciences*, *119*(2), 103-107.
- Scaccia, N., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2021). The risk of transmitting antibiotic resistance through endophytic bacteria. *Trends in Plant Science*, *26*(12), 1213-1226.
- Schaad, N., Jones, J., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* (3ra. ed.). New York: The American Phytopathological Society.
- Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annual review of public health*, *29*:151-169.
- Srichamnong, W., Kalambaheti, N., Woskie, S., Kongtip, P., Sirivarasai, J., & Matthews, K. R. (2021). Occurrence of antibiotic-resistant bacteria on hydroponically grown butterhead lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata). *Food Science & Nutrition*, *9*(3), 1460-1470.
- Stockwell V. O., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, *31*:1. 199-210
- Sundin, G. 2002. Distinct recent lineages of the strA-strB streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Current Microbiology*, *45*: 63-69.
- Sykes, J. E. (2013). Gram negative bacterial infections. *Canine and Feline Infectious Diseases. Part II Major infectious diseases and their etiologic agents. Section, 2*, 355-364.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, *30*(12), 2725-2729.

- Taylor, P., & Reeder, R. (2020). Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience*, 1(1), 1-14.
- Van Elsas, J. D., Turner, S., & Bailey, M. J. (2003). Horizontal gene transfer in the phytosphere. *New phytologist*, 157(3), 525-537.
- Vargas-Fernández, J. P., Wang-Wong, A., & Muñoz-Fonseca, M. (2022). Microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave del fruto de banano (*Musa* sp.) y alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel in vitro. *Agronomía Costarricense*, 46(2), 61-76
- Vidaurre-Barahona, D., Wang-Wong, A., & Uribe-Lorío, L. (2021). *Erwinia billingiae* causes bacterial canker of mango (*Mangifera indica*) in Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 32(1), 306-315.
- Vidaver, A. K. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin. Infect. Dis.* 34: S107–S110.
- Vidaver, A. K., & Lambrecht, P. A. (2004). Bacteria as plant pathogens. *The plant health Instructor*, 10.
- Villalobos, W., Moreira, L., Rivera, C., Bottner, K. D., & Lee, I. M. (2002). First report of an aster yellows subgroup 16SrI-B phytoplasma infecting chayote in Costa Rica. *Plant Disease*, 86(3), 330-330
- Vindas, M. J. (2019). Espectro de resistencia, estructura genética y relaciones evolutivas de plásmidos conjugativos con resistencia a tetraciclinas aislados de ecosistemas agropecuarios costarricenses. [Tesis Maestría Académica en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- WHO. (2019). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>
- Wright, J. & Lacy, M. (1988) Increase of disease resistance in celery cultivars by regeneration of whole plants from cell suspension cultures. *Plant disease*, 72, 256-259.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67:1613-1617
- Zhang, Q., Melcher, U., Zhou, L., Najjar, F. Z., Roe, B. A., & Fletcher, J. (2005). Genomic comparison of plant pathogenic and nonpathogenic *Serratia marcescens* strains by suppressive subtractive hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12).

CAPÍTULO 2: Cambios en la estructura de la comunidad bacteriana en el proceso de vermicompostaje de excretas bovinas y su influencia en la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina*

2.1 Introducción

La producción lechera en granjas pequeñas se caracteriza por la limitación de espacios que da como resultado la acumulación de excretas y residuos orgánicos, que ha llevado a prácticas de eliminación tales como la aplicación en campos agrícolas sin tratamiento previo. Estas prácticas pueden causar problemas ambientales serios, incluyendo una entrada excesiva a los suelos, de sales inorgánicas, metales traza potencialmente dañinos, patógenos, bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos, e incluso residuos de estas moléculas, lo que presenta riesgos para la salud pública, animal y ambiental (Black et al., 2021; Lazcano et al., 2008; Holman et al., 2016, Pandey et al., 2018, Virto et al., 2022; Zhang et al., 2014).

Una alternativa a algunos de los problemas relacionados con el exceso de residuos y la contaminación resultante de la aplicación de estiércol es biotransformar las excretas en fertilizantes orgánicos como bioles, compost, vermicompost y té de compost (Gupta et al., 2016; Lazcano et al., 2008; Zamora et al., 2017).

El vermicompostaje es una tecnología en la que se produce la biooxidación y estabilización del material orgánico mediante la acción conjunta de lombrices y microorganismos (Aira et al., 2007; Artavia et al., 2010). Cuando el sustrato que alimenta las lombrices son excretas, en especial las líquidas como en lecherías, se requiere una etapa de al menos 14 días de pre-compostado, que reduzca la humedad, el nivel de amonio y energía calórica presente en las excretas frescas, de manera que no sean dañinas para las lombrices, además de reducir la presencia de patógenos (Mupondi et al., 2011, <https://ag.umass.edu/crops-dairy-livestock-equine/fact-sheets/vermicomposting-on-dairy-farms>), consultado en julio 2022).

Una vez iniciado el proceso de vermicompostaje, se da una fase activa en la que las lombrices y los microorganismos asociados procesan el sustrato. Las lombrices fragmentan los residuos orgánicos en partículas finas al pasarlas por una molleja y se alimentan de microorganismos que crecen en la materia orgánica. Este proceso acelera la descomposición de la materia orgánica, aumenta las poblaciones microbianas y la superficie de contacto de la materia orgánica al ser triturada, oxidada y estabilizada (Gómez-Brandón et al., 2012; Kiyasudeen et al., 2016).

*Los datos presentados en este capítulo fueron publicados primero en (Waste and Biomass Valorization, 1-16, 2023), y en (UNED Research Journal, e4586-e4586, 2023)

Además, la microbiota intestinal y la secreción de iones de calcio por parte de la lombriz pueden aumentar ligeramente la alcalinidad del material (Artavia et al., 2010; Bollo, 1999; Ferruzi, 1994; Furlong et al., 2002; Swati & Hait, 2018). Esta etapa es seguida de la fase de maduración que ocurre una vez que la lombriz se desplaza a las capas más frescas del residuo y que es realizada por la flora microbiana presente en el vermicompost inmaduro (Lazcano et al., 2008; Pathma & Sakthivel, 2012). Como producto del proceso, ocurre un cambio en la población microbiana del estiércol de vaca, incluyendo la disminución de patógenos potenciales (Eastman et al., 2001; Hu et al., 2020; Swati & Hait, 2018; Uribe et al., 2009).

Los cambios en la comunidad microbiana del sustrato ocurren en el intestino de la lombriz de tierra, donde su microbiota especializada influye en el metabolismo, ciclaje de nutrientes y el sistema inmunológico (Aira et al., 2015; Berg et al., 2016). Las lombrices de tierra epigeas que ingieren heces de animales utilizan nutrientes procesados y microorganismos como fuentes de energía y alimento (Aria et al., 2015; Zhang et al., 2000). Se ha encontrado una disminución en la abundancia y diversidad de bacterias presentes en el estiércol en la zona de la molleja y el intestino anterior de *Eisenia fetida* (Hu et al., 2020).

El vermicompostaje se considera una de las mejores alternativas para el tratamiento de residuos contaminados con patógenos (Eastman et al., 2001; Pathma & Sakthivel, 2012; Uribe et al., 2009), y la degradación de antibióticos, como las tetraciclinas (Huang et al., 2018; Li et al., 2022; Wang et al., 2019). Los mecanismos directos para la reducción de patógenos que ocurren en el intestino de la lombriz podrían deberse a las enzimas digestivas, la molienda mecánica y la secreción de fluidos celómicos con propiedades antibacterianas. Además, los efectos indirectos como la estimulación del antagonismo y la competencia por la microflora endémica de las lombrices y la aireación por la actividad de excavación también pueden disminuir los coliformes presentes en los residuos (Hu et al., 2020; Kiyasudeen et al., 2016; Swati & Hait, 2018).

Los llamados téis de compost se pueden obtener a partir de vermicompost y se utilizan como fertilizantes líquidos para aplicación foliar o al suelo. Esta práctica ha aumentado su popularidad debido a las cantidades relativamente pequeñas de vermicompost necesarias para su fabricación y su eficacia comprobada en la estimulación del crecimiento vegetal y el control de plagas y enfermedades (Arancon et al., 2019; Kiyasudeen et al., 2016; Scheuerell & Mahaffee, 2002), incluyendo la supresión de fitopatógenos (Arancon et al., 2007; Pant et al., 2012; Pathma & Sakthivel, 2012). El té de compost es una infusión que se prepara con compost o vermicompost y agua en una proporción que varía de 1:3 a 1:200 y debe incubarse por un tiempo definido. Puede producirse de forma anaeróbica o aeróbica, esta última por burbujeo continuo de aire. Durante el proceso se extraen microorganismos y nutrientes solubles del vermicompost (Al-Mughrabi et al., 2008; Castello et al.,

2014; Fritz et al., 2012; Zamora et al., 2017). Aunque el té de vermicompost a menudo se denomina fertilizante, su contenido de nutrientes es bajo (Zamora et al., 2017), y sus efectos se producen principalmente debido a la aplicación de una población mixta de microorganismos que recubren la superficie de las hojas de las plantas (Yatoo et al., 2021).

Es una práctica común agregar azúcares como la melaza de caña al té durante su preparación, debido a la suposición generalizada de que aumenta el número de microorganismos con capacidades de supresión de enfermedades (Duffy et al., 2004; Kiyasudeen et al., 2016; Scheuerell & Mahafee, 2002). No obstante, otros autores han reportado que la adición de azúcares, melazas o fuentes de carbono a los tés de compost induce la proliferación de coliformes y patógenos bacterianos entéricos, como *Escherichia coli* y *Salmonella*, respectivamente (Duffy et al., 2004; Giacomini, 2012; Kiyasudeen et al., 2016). Además, existe el riesgo potencial de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los materiales derivados de diferentes tipos de estiércol que podrían ser transportados a suelos y plantas (Zalewska et al., 2021).

Los antibióticos se han utilizado en los sistemas de producción de animales de interés zootécnico durante más de 60 años para la prevención y terapia de patologías (Virto et al., 2022). A nivel mundial, la mayoría de los antibióticos que se utilizan en la producción de leche se dirigen a la promoción del crecimiento (cuando se permite), a la profilaxis y al tratamiento de enfermedades como la mastitis o la metritis, además del secado de la vaca (Zalewska et al., 2021). Dentro de los antimicrobianos más utilizados para controlar las enfermedades bacterianas en el ganado lechero en Estados Unidos están las tetraciclinas (Oliver et al., 2020). En Costa Rica, la tetraciclina como medicamento es utilizada en ganado bovino lechero como oxitetraciclina HCL (Emicina® 100®), (Engemycin® 10 % L/A), L.A 200 (Emicina L/A®-) y oxitetraciclina L.A 300 mg/ml (Tetradur®), con un período de retiro después del último tratamiento de 72 a 144 horas (Carmona & Vindas, 2008). Se utiliza en diversas patologías, como la mastitis, la dermatitis digital, y problemas reproductivos, y es el antimicrobiano más utilizado en ganado lechero, habiendo reportes de su uso en el 72 % de 60 fincas artesanales de Costa Rica (Carmona & Vindas, 2008; Tortós et al., 2006).

Se ha estimado que la clortetraciclina presenta una tasa de excreción de 65 % en excretas de ganado (Aust et al., 2008), y se han detectado tanto residuos de tetraciclinas como genes y bacterias resistentes a este antimicrobiano en diferentes estudios a nivel mundial (Casey et al., 2013; Kraemer et al., 2019; Oliver et al., 2020; Zalewska et al., 2021). La exposición de productores a bacterias resistentes es de gran preocupación, ya que puede trasladarse a las comunidades en riesgo por el contacto persona a persona (Silbergeld et al., 2008). Al respecto, se han detectado casos de infecciones con bacterias resistentes a meticilina en personas que viven y/o trabajan en granjas de producción porcina y bovina (Carrel et al., 2014; Huijsdens et al., 2006), por lo que la aplicación de

estiércol en campos de cultivo cercanos a viviendas humanas puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes a los antibióticos (Kumar et al., 2005). Al respecto, La OMS considera al uso de antibióticos en el sector agropecuario un problema de salud pública, y en unión con la FAO, desarrolló una estrategia global para la contención de la resistencia a los antibióticos, mediante recomendaciones para su uso en la agricultura (OMS, 2018; FAO, 2021). En Costa Rica, la presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina en sedimentos cercanos a granjas porcinas (Vindas, 2019), en alimentos para cerdos y tilapias (Granados-Chinchilla & Rodríguez, 2014; Gutiérrez et al., 2010), y residuos de antibióticos fueron reportados en leche desde el año 1992 (Calderón, 1992), sin embargo, no se ha reportado la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en excretas de ganado lechero.

La composición y la dinámica de las comunidades microbianas durante el proceso de vermicompostaje han sido analizadas mediante enfoques dependientes e independientes del cultivo (Gómez-Brandon et al., 2011; Huang et al., 2013; Li et al., 2013), como el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (RFLP), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE) y biblioteca de clones (Li et al., 2013; Partanen et al., 2010; Szekely et al., 2009; Vivas et al., 2009). Sin embargo, estos métodos tienen limitaciones ya que solamente detectan los organismos predominantes y por ende no permiten obtener información detallada sobre la estructura de la comunidad microbiana (de Gannes et al., 2013) en comparación con la secuenciación de amplicón de ARN 16S. Los enfoques metagenómicos que estudian los procesos de vermicompostaje son escasos (Cai et al., 2018; Domínguez et al. 2021; Gómez-Brandón et al. 2020; Lv et al. 2018), además, la mayoría de estos estudios se han centrado en las comunidades microbianas de sistemas de compostaje individuales (Fernández-Gómez et al., 2010; He et al., 2013). Este estudio, por otro lado, analiza mediante secuenciación de amplicones, las poblaciones bacterianas de los diferentes pasos del proceso de vermicompostaje, incluido el precompostaje del estiércol utilizado como sustrato, y la producción de téis de vermicompost, Adicionalmente, se determinó mediante la misma técnica la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina (antibiótico comúnmente utilizado en tratamiento veterinario en ganado bovino) a partir de muestras cultivadas del mismo proceso.

Una mejor comprensión de la variación en la estructura de la comunidad bacteriana durante este proceso realizado en pequeñas granjas lecheras puede ayudar a determinar los cambios en la población bacteriana durante cada etapa de biotransformación, con el fin de aumentar la calidad y seguridad de los productos finales.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Ubicación del estudio y colecta de muestras

El estudio se realizó en el módulo lechero de la sede del Atlántico, Turrialba, Cartago, Costa Rica (660 metros sobre el nivel del mar), en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), y en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), todos pertenecientes a la Universidad de Costa Rica. El módulo lechero es una finca dedicada a la producción de leche en condiciones tropicales, cuyo sistema manejaba en enero del 2019, momento de la colecta, 23 vacas Jersey.

Como parte del manejo de la finca, el estiércol de vaca se colectó diariamente y se colocó en un contenedor, donde fue sometido a un proceso de deshidratación y precompostaje durante 15 días. De este contenedor se tomó una muestra compuesta de estiércol bovino recién colectado (CM) y 15 días después, cuando se completó el proceso de precompostaje (CMC) (Fig. 2.1).



Fig. 2.1 Diagrama de representación del proceso de vermicompostaje llevado a cabo en el Módulo Lechero de la Sede del Atlántico (UCR), y de los téis preparados con el mismo material. CM Excretas, CMC Excretas precomposteadas, VC Vermicompost, VCT Té de vermicompost, VCTM Té de vermicompost con melaza. Publicado primero en (Waste and Biomass Valorization, 1-16, 2023) por Springer Nature.

2.2.2 Producción de vermicompost

A la fase sólida del estiércol precompostado seleccionado para este estudio, se le adicionaron lombrices rojas californianas (*Eisenia fetida*) en una densidad de 600 lombrices/0.03 m³ (Duran et al., 2009), para producir vermicompost. El vermicompostaje se realizó en una estructura abierta de

cemento de 50 cm x 40 cm y 2 m de longitud, donde la mezcla estiércol-lombrices alcanzó 15 cm de altura. Cada nuevo lote de estiércol precompostado se colocó en un extremo de la estructura con el fin de que las lombrices pudieran llegar al nuevo sustrato, manteniendo el producto final en el lado opuesto para fines de recolección. El estiércol precompostado se dispuso en el contenedor cada 30 días. La muestra de vermicompost (VC) se colectó en el extremo correspondiente al producto final del vermireactor 30 días después de haberse puesto en contacto con las lombrices.

Para efectos de este estudio, se le dio seguimiento al proceso desde el momento en que el estiércol se colocó en la pila de precompostaje hasta su último paso. Tanto las muestras compuestas de estiércol en las diferentes fases, y del vermicompost resultante de dichas excretas, fueron colectadas y trasladadas en hieleras al laboratorio del Área de Microbiología Ambiental del CIBCM, donde fueron almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento. Parte de la muestra de vermicompost fue utilizada inmediatamente para producir los tés de vermicompost.

2.2.3 Preparación del té de vermicompost

se prepararon en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas siguiendo la metodología descrita por Zamora et al., (2017). Para el té sin aditivo (VCT), se colocaron 100 g del vermicompost en una bolsa de malla, la cual se sumergió en un recipiente de 10 l con 5 l de agua desionizada. La mezcla se incubó con aireación constante durante 18 horas con una bomba de pecera de aire de 3 l/min. El té suplementado con melaza (VCTM), fue preparado utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, añadiendo 10 ml de melaza de caña (Natural La Fuente) al agua desionizada como fuente de carbono.

2.2.4 Recuperación de bacterias resistentes a tetraciclina

Para determinar la presencia de bacterias resistentes, 1 ml de muestra líquida (tés de vermicompost) y 0,1 g de muestras sólidas (excretas y vermicompost) fueron inoculadas en 10 ml de Caldo nutritivo (Oxoid) suplementado con 10 µg/ml de oxitetraciclina (Sigma-Aldrich) . Debido a que los cortes para la determinación de la susceptibilidad/resistencia de un microorganismo se realizan con especies bacterianas de origen clínico humano y no existen directrices para la determinación de la susceptibilidad para bacterias ambientales, se utilizó la concentración de 10 µg/ml basado en la recomendación para patógenos humanos entéricos, no entéricos y anaerobios según la guía CLSI (2017), ya que es superior a la concentración mínima inhibitoria intermedia para estos grupos bacterianos. Los tubos fueron incubados por 72 h o hasta que se presentó crecimiento a 30°C en condiciones aerobias.

2.2.5 Extracción de ADN y análisis químicos

Para la extracción de ADN, se tomó 1 g de las muestras sólidas, seleccionado de una submuestra compuesta de 100 g. En el caso de las muestras líquidas, se emplearon 15 mL de una muestra de 100 mL, la cual fue sometida a centrifugación para obtener un botón que se utilizó en el proceso de extracción. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit Nucleospin Soil para ADN genómico (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de las muestras que fueron inoculadas en el caldo suplementado con tetraciclina para la búsqueda de bacterias resistentes, se centrifugó 3 ml del cultivo y el botón fue sometido a extracción de ADN utilizando el kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel), según instrucciones del fabricante. El ADN derivado de estos cultivos fue también sometido a secuenciación de amplicones del gen ARNr 16S.

La integridad del ADN de todas las muestras se examinó en geles de agarosa al 1 % mediante electroforesis y se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 2000c Thermo Scientific (Wilmington, DE, EE. UU.). Los ácidos nucleicos se almacenaron a -20 °C.

Se realizó el análisis químico (N, P y K) de cada una de las muestras utilizando Espectrometría de Emisión Óptica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) en el Laboratorio de suelos y foliares del Centro de Investigaciones Agronómicas.

2.2.6 Secuenciación y procesamiento de secuencias

Las muestras de ADN se enviaron a Macrogen Inc. (Corea del Sur) para la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S ARNr utilizando MiS-eq Platform (Illumina, Inc). Los datos se procesaron utilizando QIIME2 (versión 2018.11) (Bolyen et al., 2019, <https://qiime2.org>) y sus complementos. Se aplicó el complemento 'dada2' (Callahan et al., 2016) para lecturas truncadas (--p-trim-left 0, --p-trunc-len 280). Se utilizó el método vsearch uchime_ref para identificar secuencias quiméricas y se eliminaron las secuencias de mitocondrias y cloroplastos. La taxonomía de los ASV (Secuencias variantes de amplicón) se asignó frente al conjunto de datos de referencia no redundante SILVA 16S/18S rDNA (SSURef 132 NR) (Quast et al., 2012) con el clasificador de características classify-sklearn. Una vez obtenido el cuadro de ASVs con sus abundancias e identificaciones, la clasificación taxonómica derivada del análisis bioinformático fue comprobada para los ASVs con más de 0.05 % de la abundancia total, utilizando la base de datos curada de EzBioCloud (Yoon et al., 2017), que almacena secuencias del gen 16S rRNA de cepas tipo y de nombres válidamente publicados. Se utilizaron los criterios publicados por Chun et al., (2010) para la asignación taxonómica de cada lectura: especie ($x \geq 97 \%$), género (97% ; $x \geq 94 \%$), familia (94% ; $x \geq 90 \%$), orden (90% ; $x \geq 85$

%), clase (85 %; $x \geq 80$ %) y filo (80 %; $x \geq 75$ %). Si se encontró una similitud por debajo del punto de corte, la lectura fue asignada a un grupo "sin clasificar" (unc.).

2.2.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron en el software Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research (PRIMER7) (Clarke & Goyle, 2015). Se calcularon los valores de similitud de Bray-Curtis a partir de los datos transformados utilizando raíz cuadrada de las abundancias estandarizadas de los ASV generados, así como de las sumas de los géneros y filos identificados para las comunidades bacterianas de las muestras crudas. La matriz de similitudes se formó utilizando la agrupación jerárquica aglomerativa, y las divisiones resultantes se probaron con la rutina SIMPROF (perfiles de similitud) de tipo 1 para determinar similitudes significativas ($P < 0,05$) en la estructura de las comunidades de las muestras estudiadas. La matriz se visualizó mediante una ordenación multidimensional no métrica (nMDS) para ilustrar las disimilitudes entre los agrupamientos de comunidades microbianas. En el caso del análisis SIMPER (porcentaje de disimilitud) fue utilizado para calcular la contribución de cada taxón (%) a la disimilitud de Bray-Curtis entre las muestras pareadas. Se calcularon las estimaciones de diversidad de Shannon (H') a la matriz de ASVs. Además, se llevó a cabo un análisis de curvas de coherencia, una combinación de ejecuciones de SIMPROF dentro de un análisis de agrupación de géneros, para identificar grupos de taxones coherentes que tienen un patrón similar de abundancias entre muestras. Para esto, los géneros se redujeron seleccionando sólo los 28 géneros que contribuyeron al menos al 2 % de la abundancia total en cualquier muestra. Se construyó una matriz de similitud entre géneros utilizando el Índice de Asociación de Whitaker (Sommerfield & Clarke, 2013) y se utilizó la rutina de SIMPROF de tipo 2 para determinar si los géneros estaban asociados entre sí en términos de su variación numérica a lo largo de la serie de muestras analizadas. Se realizó una agrupación jerárquica aglomerativa de estos géneros y los grupos resultantes fueron probados con SIMPROF tipo 3, para determinar si los grupos de géneros covariaban coherentemente (Clarke & Goyle, 2015; Sommerfield et al., 2014). Además, se utilizó el gráfico de matriz de sombra para mostrar las relaciones entre los grupos de muestras y las especies o géneros presentando los taxones más importantes, determinados por los grupos coherentes explicados anteriormente. Tanto las muestras como los géneros fueron agrupados jerárquicamente de forma independiente. En el caso de las comunidades bacterianas de los caldos suplementados con tetraciclina, se calcularon las estimaciones de diversidad de Shannon (H') a la matriz de ASVs, y los valores de similitud de Bray-Curtis a partir de los datos con la transformación de las abundancias de los ASV generados, así como de las sumas de las especies. La matriz de similitudes se formó utilizando la agrupación jerárquica aglomerativa, y las divisiones resultantes se probaron con la rutina

SIMPROF de tipo 1 para determinar similitudes significativas ($p < 0,05$) en la estructura de las comunidades de las muestras estudiadas. La matriz se visualizó mediante una ordenación multidimensional no métrica (nMDS) para ilustrar las disimilitudes entre los agrupamientos de comunidades microbianas.

2.3 Resultados

2.3.1 Cambios en la estructura de las comunidades bacterianas durante el proceso de vermicompostaje

El análisis bioinformático dio como resultado un total de 297569 secuencias, dentro de un rango de 37766 en VCTM hasta 66510 lecturas en la muestra VCT. Estas secuencias fueron clasificadas en 2642 ASVs, observándose una mayor cantidad de ASVs en la muestra VC (1029) seguido por el té sin aditivo (966), y la menor en el VCTM (146), que mostró la menor diversidad (3,4 frente a 6,3 en VCT) (Cuadro 2.1).

Veintiocho géneros de los 500 identificados en este estudio presentaron una abundancia mayor a 2 %. El análisis de grupos coherentes dio como resultado seis grupos (a-e) de taxones que se comportaron de manera semejante en cuanto a su abundancia a través de las muestras según el índice de asociación de Whitaker (Cuadro 2.2, Fig. 2.2).

Cuadro 2.1. Parámetros químicos y diversidad de las muestras relacionadas con el proceso de vermicompostaje.

Muestras	Descripción	Análisis químicos				Análisis bioinformático			
		pH	N	P	K	N° Reads	H ASVs (log e)	% ASVs NI ^a	
CM	Estiércol de vaca	8.5	2.42	1.06	0.56	63949	588	6.01	59
CMC	Estiércol precompostado	8.4	2.29	1.06	0.61	63774	654	6.07	55
VC	Vermicompost	8.2	2.48	2.64	1.42	65570	1029	6.2	72
TVC	Té de vermicompost	8.1	<0.01	ND	ND	66510	966	6.27	68
TVCM	Té de vermicompost + melaza	6.7	<0.01	0.02	ND	37766	146	3.4	30

Nota: ND no detectado, H: Diversidad de Shannon. Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) datos en %.

^a Porcentaje of ASVs que no fueron clasificados a nivel de especie y género.

2.3.2 Precompostaje de excretas bovinas

El pH y contenido de N, P y K fue similar en las excretas y en el material precompostado (Cuadro 2.1). De igual manera, las comunidades bacterianas de las muestras de excretas frescas y precompostadas se agruparon con un 92 % de similitud de Bray Curtis, según el análisis de Simprof

tipo I ($p < 0.5$) a nivel de filo (Fig. 2.2A). Los filos predominantes en CM disminuyeron en CMC, siendo estos Firmicutes, con un 58 % y 54 % de la abundancia total, seguidos por Bacteroidetes (30 % y 35 %) y las Proteobacterias con 6 % y 4 %, respectivamente (Cuadro S2.1, Fig 2.2A). Estos tres filos contribuyeron significativamente con la similitud Bray Curtis entre estas muestras (Cuadro 2.2), con un 35.9 %, 26.9 % y 9.2 %, respectivamente. Estos 3 filos junto con las Spirochaetes y Tenericutes representaron el 97 % de las secuencias de las excretas.

Por otro lado, se identificó un mayor número de géneros en la excreta precompostada (141) que en CM (114), sin embargo, los 14 géneros con abundancia mayor a 2 %, que fueron exclusivos o dominantes en CM también lo fueron en CMC (Cuadro 2.2, Fig. 2.2C). Estos fueron agrupados por el análisis Simprof tipo 2 (grupos coherentes) en los grupos a, b, c y d (Fig. 2.3). En el grupo a, se agrupan, *Sporobacter* y unc. Bacteroidales, unc. Ruminococcaceae, unc. Lachnospiraceae, unc. Bacteroidaceae, *Alistipes* y unc. Christensenellaceae, que tuvieron abundancias relativas semejantes (las mayores de estas muestras), con los últimos 3 aumentando en el período de 15 días de precompostaje. El grupo b estuvo conformado por *Bacteroides*, *Treponema*, unc. Porphyromonadaceae y unc. Erysipelotrichaceae, que presentaron abundancias significativamente mayores en CMC. *Succinivibrio* y *Eubacterium* (grupo c), y *Clostridium* (grupo d), se observaron en mayor proporción en las excretas frescas. El género *Clostridium* (grupo d) estuvo presente en todas las muestras del estudio, en mayor proporción en las excretas frescas (4 %) que en CMC (2 %). Catorce ASVs clasificados como *Clostridium* fueron detectados en CM, con semejanza con accesiones de heces de animales y reactores anaerobios, además 5 ASVs fueron clasificados como potenciales patógenos de bovinos y otros animales, como *C. neonatale*, *C. septicum*, *C. cadaveris* y *C. subterminale*, sin embargo, solo 2 de estos ASVs fueron detectados posterior a 15 días en la muestra CMC (Cuadro S2.2). En general se encontraron 17 ASVs clasificados como patógenos potenciales de humanos y animales en las excretas frescas (Cuadro S2.3), 8 de los cuáles no se detectaron en CMC, después del precompostaje.

2.3.3 Vermicompostaje

La muestra de vermicompost presentó un pH de 8.2 y los valores de N, P y K más altos del estudio (Cuadro 2.1). Esta muestra obtuvo la mayor cantidad de de ASVs y, después de VCT, los mayores valores de secuencias y diversidad. Además, el vermicompostaje provocó un cambio en las comunidades bacterianas que llevó a una disimilitud media con las excretas de 54 % y 87 %, a nivel de filo y de género, respectivamente (Cuadro S2.3, Fig. 2.2). Estas diferencias se dan por una mayor abundancia de Proteobacterias (42 %) la disminución de Bacteroidetes (18 %) y Firmicutes (7 %) con

respecto a CMC (Cuadro S2.1). Otros filos presentes en VC que contribuyeron a la disimilitud media fueron Actinobacteria (6.2 %), Verrucomicrobia (5.0 %), Acidobacteria (4.0 %), Saccharibacteria (3.2 %), Chloroflexi (3.0 %), Planctomycetes (2.0 %), y Tenericutes (0.3 %). A pesar de que los filos Proteobacteria y Bacteroidetes también fueron abundantes en las excretas, en el vermicompost las clases predominantes de los Bacteroidetes fueron Flavobacteria (6.0 %), Cytophagia (6.1 %) y Chitinophagia (4.9 %), en contraste con la clase Bacteroidia (0.2 %), predominante en las excretas .

Cuadro 2.2. Géneros (o último nivel taxonómico identificado) con abundancia relativa mayor al 2 % de secuencias detectadas en muestras de vermicompostaje.

Filo	Clase	Género	% de secuencias del género					Grupo Simprof
			CM	CMC	VC	VCT	VCTM	
Bacteroidetes	Bacteroidia	unc. Bacteroidales	13	11	0	0	0	a
Firmicutes	Clostridia	unc. Ruminococcaceae	12	11	0	0,4	0	a
Firmicutes	Clostridia	Sporobacter	11	9	0	0	0	a
Firmicutes	Clostridia	unc. Lachnospiraceae	6,7	4	0,1	0,9	0	a
Bacteroidetes	Bacteroidia	unc. Bacteroidaceae	7,6	8	0	0	0	a
Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Alistipes</i>	3	4	0	0	0	a
Firmicutes	Clostridia	unc. Christensenellaceae	3,3	4	0,1	0,1	0	a
Firmicutes	Erysipelotrichia	unc. Erysipelotrichaceae	0,4	3	0	0	0	b
Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Bacteroides</i>	0,1	2	0	0	0	b
Spirochaetes	Spirochaetia	<i>Treponema</i>	0,7	2	0	0	0	b
Bacteroidetes	Bacteroidia	unc. Porphyromonadaceae	0,8	2	0	0	0	b
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Succinivibrio	2,6	0,7	0	0	0	c
Firmicutes	Clostridia	Eubacterium	2,1	0,6	0	0,2	0	c
Firmicutes	Clostridia	Clostridium	3,8	2	1	3	0,1	d
Firmicutes	Clostridia	Romboutsia	0,5	0,6	1	2	0,2	f
Proteobacteria	Betaproteobacteria	unc. Betaproteobacteria	0	0	4	2	0	f
Bacteroidetes	Flavobacteriia	unc. Flavobacteriales	0	0	4	2	0,2	f
Saccharibacteria	Saccharimonas	unc. Saccharimonas	0,3	0,4	3	3	0,1	f
Bacteroidetes	Cytophagia	unc. Cytophagaceae	0	0	3	2	0,3	f
Acidobacteria	Vicinamibacteria	unc. Vicinamibacteraceae	0	0	2	1	0,2	f
Bacteroidetes	Chitinophagia	unc. Saprospiraceae	0	0	2	1	0	f
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unc. Steroidobacterales	0	0	2	0,8	0,1	f
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	unc. Cellvibrionales	0	0	2	1	0,2	f
Bacteroidetes	Chitinophagia	unc. Chitinophagaceae	0	0	2	2	0,2	f
Planctomycetes	Planctomycetia	unc. Planctomycetaceae	0	0	0,6	3	0,2	f
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0	0	0,4	7	9	f
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	1,7	0,3	0,1	2	14	e
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas</i>	0	0	0,1	0,8	64	e
Otros géneros de menor abundancia			31	36	70	66	10	

Excretas frescas (CM), precompostadas (CMC), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

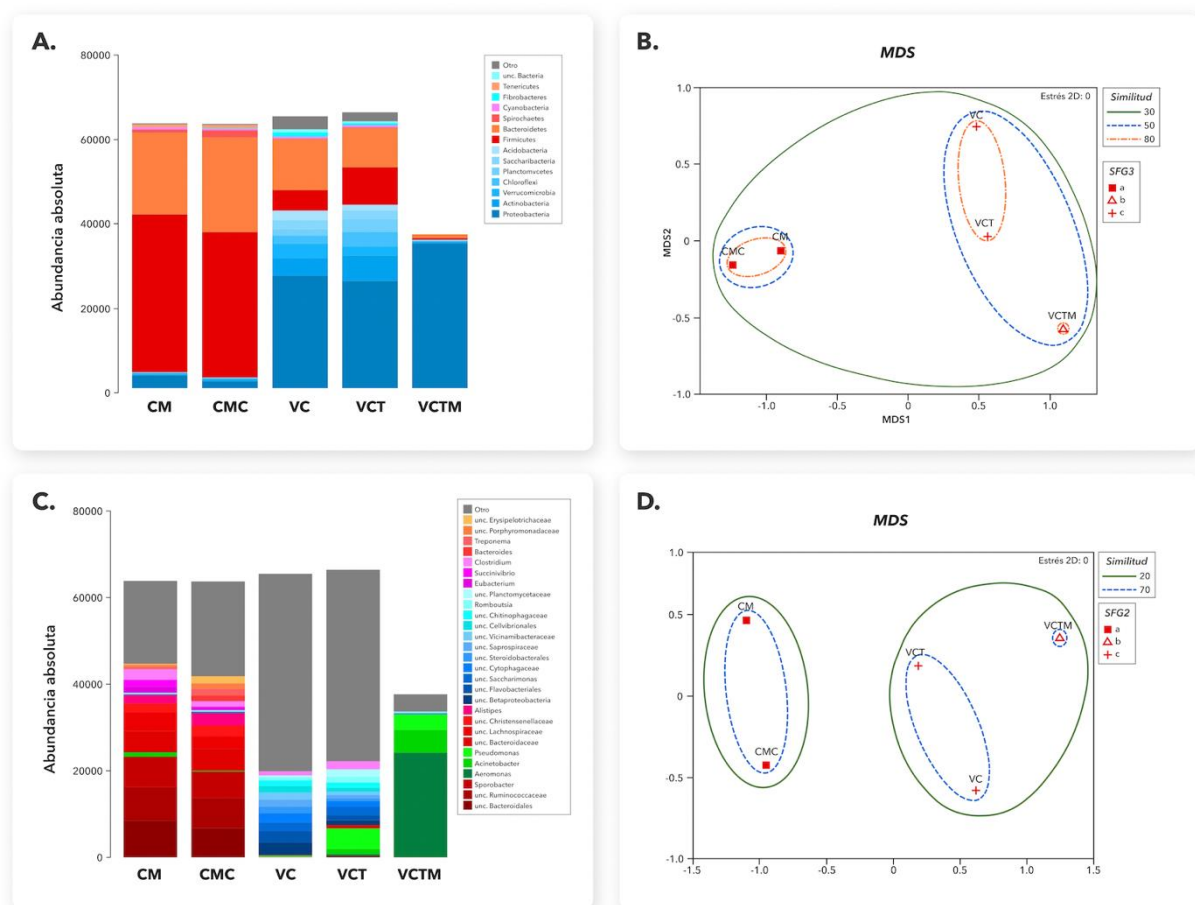


Fig. 2.2 Abundancias de Filos (A) y Géneros (B) presentes en muestras del proceso de vermicompostaje de excretas bovinas.

C y D. Ordenación del escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basado en la matriz de distancia Bray-Curtis de las muestras a nivel de Filo y Género, respectivamente. Los símbolos denotan grupos de similitud Simprof, y el porcentaje de similitud se muestra según el color de las líneas que rodean las muestra. Taxones no clasificados se indican con el prefijo unc. CM excretas bovinas, CMC excretas prefermentadas, VC vermicompost, VCT té de vermicompost, y VCTM té con melaza adicionada. Publicado primero en (Uribe-Lorío et al., Waste and Biomass Valorization, 1-16, 2023) por Springer Nature

Dentro de las Proteobacterias se observó un aumento significativo en las Gammaproteobacterias, seguido por las Alfa-, Delta- y Betaproteobacterias (Cuadro S2.4), con respecto a las excretas, que coincidieron solamente en las Gammaproteobacterias, con una abundancia de 5 % en CM y de 2 % en CMC, y que constituyó casi el 40 % de las lecturas del vermicompost.

Los géneros con abundancias mayores al 2 % que fueron exclusivos o dominantes en las muestras relacionadas con vermicompost incluyendo VCTM están clasificados en los grupos simprof

e y f. De estos 14 géneros, los que se encuentran en mayor abundancia en VC fueron miembros no clasificados de Betaproteobacteria (4.0 %), Flavobacteriales (4.0 %), Saccharimonas (3.0 %), Cytophagaceae (3.0 %), Chitinophagaceae (2.0 %), Cellvibrionales (2.0 %), Vicinamibacteraceae (2.0 %), Saprospiraceae (2.0 %), and Steroidobacteriales (2.0 %) (Fig. 2.2, Cuadro 2.2). Aparte de estos taxones, el vermicompost presentó 306 géneros más con abundancias menores al 2 % (Fig. 2.2B).

2.3.4 *Té de vermicompost sin aditivos*

La elución del vermicompost sin añadir aditivos no causó cambios en el número de secuencias, y en el índice de diversidad ni el pH (8.1) del VCT con respecto al vermicompost (Cuadro 2.1), aunque esta muestra fue la que presentó mayor índice de Shannon y cantidad de lecturas, y el segundo número de ASVs después de VC. El contenido de N, P, K fue el más bajo en las muestras analizadas.

La estructura de la comunidad bacteriana del VCT no tuvo un cambio significativo con respecto al vermicompost, ya que tanto a nivel de filo como de género agrupó con esta muestra con un 89 % y 74 % de similitud de Bray-curtis, respectivamente, según el análisis Simprof (Cuadro S2.3), lo que indica que hay una comunidad central o “core” en estas dos muestras que se mantiene durante la elución del VC. Todos los filos de mayor abundancia en VC se encontraron también en VCT, la mayoría en menor abundancia que VC excepto Firmicutes (13.4 %), Actinobacteria (8.8 %), Chloroflexi (5.1 %) and Planctinomyces (4.7 %), que aumentaron su proporción con el proceso de elaboración del té. A nivel general, en esta muestra se encontraron 29 de los 36 filos observados en el vermicompost (Cuadro S2.1), no encontrándose 7 filos que tuvieron una abundancia baja en el VC: Lentisphaerae (0.05 % abundancia en VC), Omnitrophicaeota (0.03 %), y Margulisbacteria, Tenericutes, Deinococcus-Thermus, Kiritimatiellaota, y Nanoarchaeaeota (Archaea), cada uno con 0.01 % de abundancia en VC. El VCT compartió todos los géneros de mayor abundancia del vermicompost, y, en general, se detectaron 254 de los 320 géneros totales presentes en VC (79 % de los taxones).

Los géneros con abundancias mayores al 2 % que fueron dominantes en VCT son *Pseudomonas* (7 %), *Clostridium* (3 %), *Romboutsia* (2 %), y miembros no clasificados de Planctomycetaceae (3 %) (Fig.2.2, Cuadro 2.2), y, aunque la abundancia de *Pseudomonas* fue mayor en VCTM, también fue el género más abundante de esta VCT (7 % de secuencias). Los ASVs clasificados como *Pseudomonas* tienen similitud con accesiones relacionadas con bacterias promotoras de crecimiento de plantas. De los 14 ASVs clasificados como *Clostridium*, solamente 3 identificaron con especies patógenas (*C. butyricum* y *C. neonatale*), por lo que disminuyeron con respecto a las excretas.

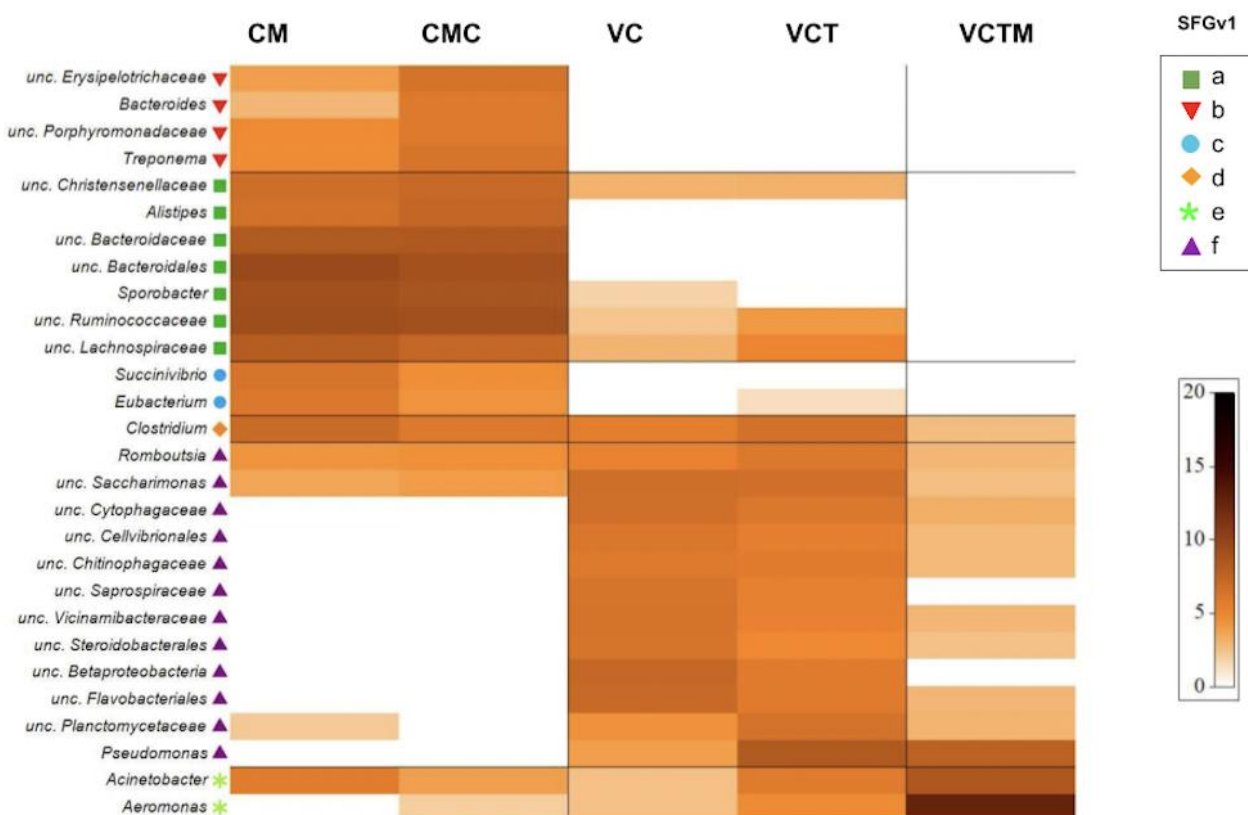


Fig. 2.3 Gráfico de sombras que muestra las relaciones entre grupos de muestras y los 28 taxones más importantes, según los cálculos de Primer7.

Tanto las muestras como las especies se agrupan jerárquicamente de forma independiente. La intensidad del sombreado indica la abundancia relativa transformada de cada taxón. Los grupos Simprof de género (SFG) se identifican mediante símbolos (a-f) ($p < 0.05$). Publicado primero en (Uribe-Lorío et al., Waste and Biomass Valorization, 1-16, 2023) por Springer Nature.

2.3.5 Té de vermicompost suplementado con melaza

La adición de melaza causó una disminución del pH del té de vermicompost a 6.7, en contraste con 8.1 del VCT. Además, presentó la menor diversidad, número de secuencias y ASVs del estudio (Cuadro 2.1), lo que llevó a una disimilitud media con las otras muestras de vermicompost de 77 % a nivel de género (Fig. 2.2B, Cuadro S2.3).

A diferencia del grupo VC-VCT, la muestra de té de vermicompost suplementado con melaza presentó casi la totalidad de las secuencias clasificadas como Proteobacteria (94 %) (Cuadro S2.1) duplicando su proporción con respecto al VCT y causando la disminución significativa de los filos de mayor abundancia presentes en la muestra VC, como Bacteroidetes que se redujo del 18 % al 3 %, Firmicutes (7 % a 0.9 %) y Actinobacterias (6 % a 1 %), además de la reducción de los filos

observados en VCT de 29 % a 15 %. Es importante recalcar que el 93 % de las Proteobacterias de esta muestra pertenecieron a la clase Gammaproteobacteria. Dentro de esta clase, los géneros *Acinetobacter* (14 %), *Aeromonas* (64 %), y *Pseudomonas* (9 %), fueron los únicos que presentaron una abundancia mayor a 2 % en VCTM (Grupo e y f). En esta muestra se identificaron ASVs también observados en VC y VCT, siendo el de mayor abundancia en VCTM similar a la cepa tipo de *Pseudomonas entomophila* (CT573326). Además, se encontraron catorce ASV pertenecientes al género *Acinetobacter*, pero solo dos con una abundancia superior al 2 %, clasificados como *A. johnsonii*. Estos ASV fueron similares a la secuencia de bacterias acumuladoras de fosfato del ecosistema de manglar en China (LBNL01000020) (Zhang et al., 2019) y secuencias relacionadas con ambientes de rizosfera, suelo y agua. Los otros ASV clasificados como *Acinetobacter* tuvieron abundancias inferiores al 0,5 %.

Por otro lado, 16 ASV se identificaron como diferentes especies del género *Aeromonas* relacionadas a accesiones provenientes de ambientes acuáticos, aguas residuales, habitantes y patógenos de peces y otros animales. Sin embargo, se encontró también similitud con secuencias de muestras de intestino de lombrices de tierra como es el caso del *A. caviae* (ASV-2056) y *A. salmonicida* (ASV-2075), similares a la accesión ON307219. Adicionalmente *A. hydrophila* (ASV-2677) y *A. rivuli* (ASV-2072), se relacionaron con las secuencias KJ993985, KJ994137, JF276566 y HM459700, reportadas en el intestino de lombrices de tierra (Liu et al., 2011). La secuencia con mayor abundancia en VCTM, *A. media* ASV-2063 (22 % de abundancia) fue homóloga a secuencias de intestino de *E. fetida* (KU933318) (Perez-Perez et al., 2018). En el caso de otras especies abundantes como *A. hydrophila* (16 %) y *A. rivipollensis* (15 %), también presentaron alta similitud con secuencias de *Aeromonas* aisladas de infecciones en peces y/o presentando resistencia a diversos antibióticos.

Además de los géneros anteriores, se detectaron en baja abundancia, solamente en esta muestra Gamaproteobacterias clasificadas como coliformes o potenciales patógenos como *Citrobacter* (1 %), *Cronobacter* (1 %) y *Enterobacter cloacae* (0.2 %).

2.3.6 Presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en muestras del proceso de vermicompostaje

El análisis bioinformático de las comunidades bacterianas cultivables obtenidas a partir de los caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina, dio como resultado 105321 secuencias distribuidas en las 5 muestras clasificadas en 58 ASVs, utilizando la técnica de la secuenciación masiva para identificar la totalidad de las bacterias cultivables resistentes (Cuadro 2.3, Cuadro S2.5). El número de ASVs resistentes a oxitetraciclina presentes en cada caldo fue mayor en la muestra de

las excretas cultivadas (CM-TB) que disminuyeron a 10 en la muestra de excretas precompostadas (CMC-TB). El menor número se observó en la muestra de vermicompost (VC-TB) con solo 5 ASVs, sin embargo, hubo un incremento en el número de ASVs resistentes cuando se prepararon los té, tanto el VCT-TB como la muestra cultivada a partir de té suplementado con melaza (VCTM-TB) (Fig. 2.4).

Cuadro 2.3 Diversidad de comunidades bacterianas cultivables resistentes a 10 $\mu\text{g/ml}$ de oxitetraciclina del proceso de vermicompostaje de excretas bovinas

Muestras	ASVs	N	H'(log e)
CM-TB	32	14356	2.0
CMC-TB	10	6029	1.4
VC-TB	5	45441	1.0
VCT-TB	23	14667	2.3
VCTM-TB	19	24828	1.3

Cultivos de excretas (CM-TB y CMC-TB), vermicompost (VC-TB), té de vermicompost (VCT-TB y VCTM-TB).

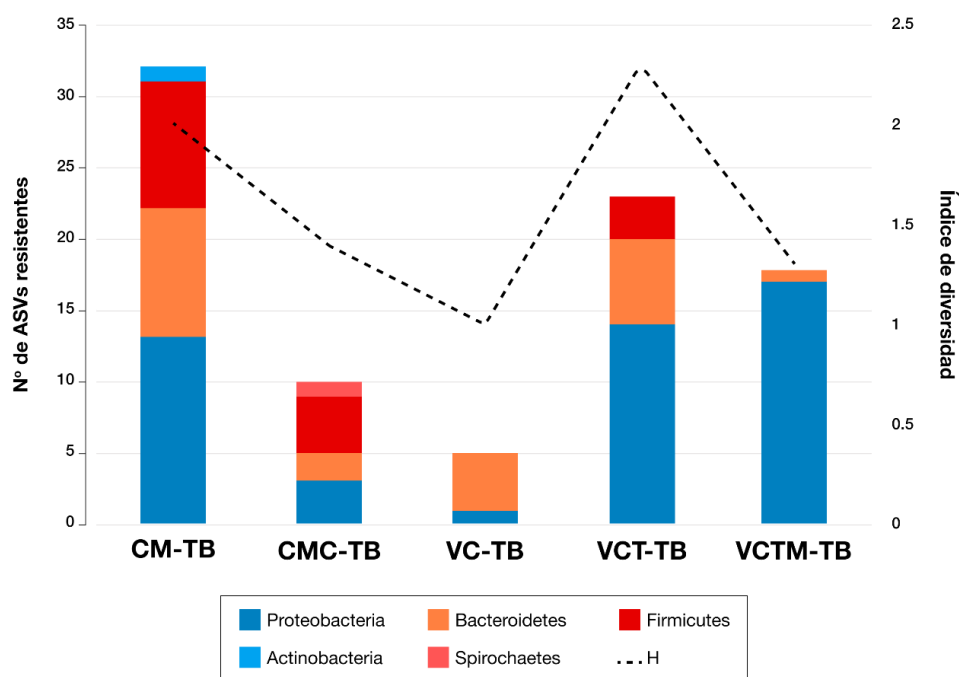


Fig. 2.4 Abundancia de filos y diversidad de muestras de comunidades cultivables resistentes a oxitetraciclina obtenidas del proceso del vermicompostaje de excretas bovinas. Caldos de cultivo de excretas de ganado frescas (CM-TB), precompostadas (CMC-TB), vermicompost (VC-TB) y tes de vermicompost sin (VCT-TB) y con melaza (VCTM-TB).

La mayor diversidad se encontró en la muestra VCT-TB y la menor en VC-TB, y en general los índices de diversidad fueron menores que los detectados en las muestras crudas como es de esperarse (Cuadro 2.1). La mayoría de estos ASVs pertenecen a los filos Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, los cuáles estuvieron presentes en todas las muestras, además, se detectó un representante de Actinobacterias resistente a tetraciclina y uno de Spirochaetes (*Treponema*) en CMC-TB. En las excretas bovinas, Proteobacteria fue el filo más representado, con Firmicutes y Bacteroidetes también en alto número, cuya distribución fue semejante a la muestra VC-TB, y en menor grado en VCTM-TB, en la que dominaron las Proteobacterias solamente. Las excretas precompostadas tuvieron los mismos filos presentes que CM-TB, a excepción de Spirochaetas. El menor número de ASVs resistentes fue observado en la muestra VC-TB, la mayoría perteneciente a los Bacteroidetes (Fig. 2.4, Cuadro 2.3).

2.3.7 Análisis de géneros bacterianos presentes en comunidades cultivables resistentes del proceso de vermicompostaje

En el Cuadro 2.4 se presentan los 30 géneros detectados en las muestras de cultivos analizadas, dentro de los cuáles se encontraron también algunos géneros clasificados como más abundantes en las muestras crudas.

Los ASVs resistentes a oxitetraciclina presentes en la muestra de excretas frescas se clasificaron en 19 géneros. Dentro de estos, los géneros dominantes en la muestra cruda CM como *Bacteroides*, *Succinivibrio* y miembros no clasificados de Bacteroidaceae y Bacteroidales (Cuadro 2.2), presentaron resistencia a tetraciclina, si bien en bajo número de secuencias. Cabe destacar que ninguno de estos ASVs fue observado en otras muestras, al igual que los otros géneros que presentaron resistencia en CM-TB con solo un representante, como *Bifidobacterium*, *Alloprevotella*, *Streptococcus*, entre otros. Este no es el caso de ASVs en los géneros *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Escherichia-Shigella* y *Proteus*, detectados tanto en los cultivos de excretas como en los téis de vermicompost. Los ASVs *Aeromonas caviae* ASV-2056, *A. hydrophila* ASV-2677 *Escherichia-Shigella* ASV-2143, *Acinetobacter schindleri* ASV-2204 y *A. colistiniresistens* ASV-2213 se encontraron en mayor abundancia en CM-TB, además de *Kurthia massiliensis* ASV-830 (Tabla S2.5).

En las excretas precomposteadas hubo una disminución de los ASVs (32 vs. 10) y géneros (19 vs 8) resistentes identificados en comparación con las excretas frescas, siendo *Prevotella* (2 ASVs), *Treponema* (1 ASVs) y *Rummeliibacillus* (1 ASVs) exclusivos de CMC-TB. En el caso de *Bacillus*

sp. y *Solibacillus silvestris*, aunque compartidos con VC-TB, la abundancia fue mayor en esta muestra.

Cuadro 2.4 Número e identificación a nivel de género de ASVs detectados en caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina cultivados a partir de muestras crudas del proceso de vermicompostaje.

Filo	Género	CM-TB	CMC-TB	VC-TB	VCT-TB	VCTM-TB	ASVs por género
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	1	0	0	0	0	1
Bacteroidetes	<i>Myroides</i>	0	0	3	1	0	4
Bacteroidetes	unc. Bacteroidaceae*	3	0	0	0	0	3
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium</i>	0	0	1	1	1	3
Bacteroidetes	unc. Bacteroidales*	2	0	0	0	0	2
Bacteroidetes	<i>Prevotella</i>	0	2	0	0	0	2
Bacteroidetes	unc. Saprospiraceae	0	0	0	1	0	1
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i> *	1	0	0	0	0	1
Bacteroidetes	unc. Muribaculaceae	1	0	0	0	0	1
Bacteroidetes	<i>Alloprevotella</i>	1	0	0	0	0	1
Bacteroidetes	<i>Faecalibacter</i>	1	0	0	0	0	1
Firmicutes	<i>Clostridium</i> *	2	1	0	3	0	6
Firmicutes	<i>Kurthia</i>	2	0	0	1	0	3
Firmicutes	<i>Streptococcus</i>	2	0	0	0	0	2
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	0	1	0	1	0	2
Firmicutes	<i>Solibacillus</i>	0	1	0	1	0	2
Firmicutes	<i>Rummeliibacillus</i>	0	1	0	0	0	1
Firmicutes	<i>Paeniclostridium</i>	1	0	0	0	0	1
Firmicutes	<i>Turicibacter</i>	1	0	0	0	0	1
Firmicutes	<i>Phascolarctobacterium</i>	1	0	0	0	0	1
Proteobacteria	<i>Aeromonas</i> *	3	0	0	8	8	19
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i> *	6	2	0	2	7	17
Proteobacteria	<i>Escherichia-Shigella</i>	1	1	0	1	1	4
Proteobacteria	<i>Proteus</i>	1	0	0	1	1	3
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> *	0	0	0	1	1	2
Proteobacteria	<i>Comamonas</i>	0	0	1	0	0	1
Proteobacteria	<i>Shewanella</i>	0	0	0	1	0	1
Proteobacteria	<i>Succinivibrio</i> *	1	0	0	0	0	1
Proteobacteria	<i>Citrobacter</i>	1	0	0	0	0	1
Spirochaetes	<i>Treponema</i> *	0	1	0	0	0	1
ASVs por muestra		32	10	5	23	19	

* Géneros con abundancia mayor a 2 % en muestras crudas originales.

Caldos de cultivo de excretas de ganado frescas (CM-TB), precompostadas (CMC-TB), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

En VC-TB, solamente fueron detectados tres géneros (la menor cantidad del estudio): *Myroides* (3 ASVs), *Comamonas* (1 ASV) y *Chryseobacterium* (1 ASV), este último también presente en los téis de vermicompost. A diferencia del VC-TB, las muestras inoculadas con los téis aumentaron en número de géneros resistentes, VCT-TB y VCTM-TB con 13 y 7 géneros, respectivamente. En ambas muestras se observó una mayor cantidad de ASVs pertenecientes al género *Aeromonas* (8), seguido por *Acinetobacter* (2 en VCT-TB vs 7 en VCTM-TB). *Aeromonas caviae* ASV-2073 y *A. sanarellii* ASV-2056 fueron los ASVs más abundantes en estas muestras, y en menor medida en las excretas frescas. Otros géneros bacterianos compartidos entre VCT-TB y las muestras de excretas fueron *Clostridium*, *Kurthia*, *Bacillus*, *Solibacillus*, *Proteus*, *Acinetobacter* y *Escherichia-Shigella*. Estos tres últimos géneros también fueron detectados en el cultivo de la muestra VCTM-TB, no obstante, ninguno fue observado en el caldo inoculado con vermicompost.

Las comunidades bacterianas en los caldos suplementados con oxitetraciclina de las excretas y los téis de vermicompost, tanto con o sin melaza se agruparon con una similitud de Bray-Curtis de 30 % a nivel de género, mientras que entre las muestras VCT-TB y VCTM-TB fue de 58 % ($p < 0.05$). No se encontró similitud entre las muestras de vermicompost y excretas precompostadas, ni con ninguna de las otras muestras con respecto a sus comunidades bacterianas resistentes (Figura 2.5).

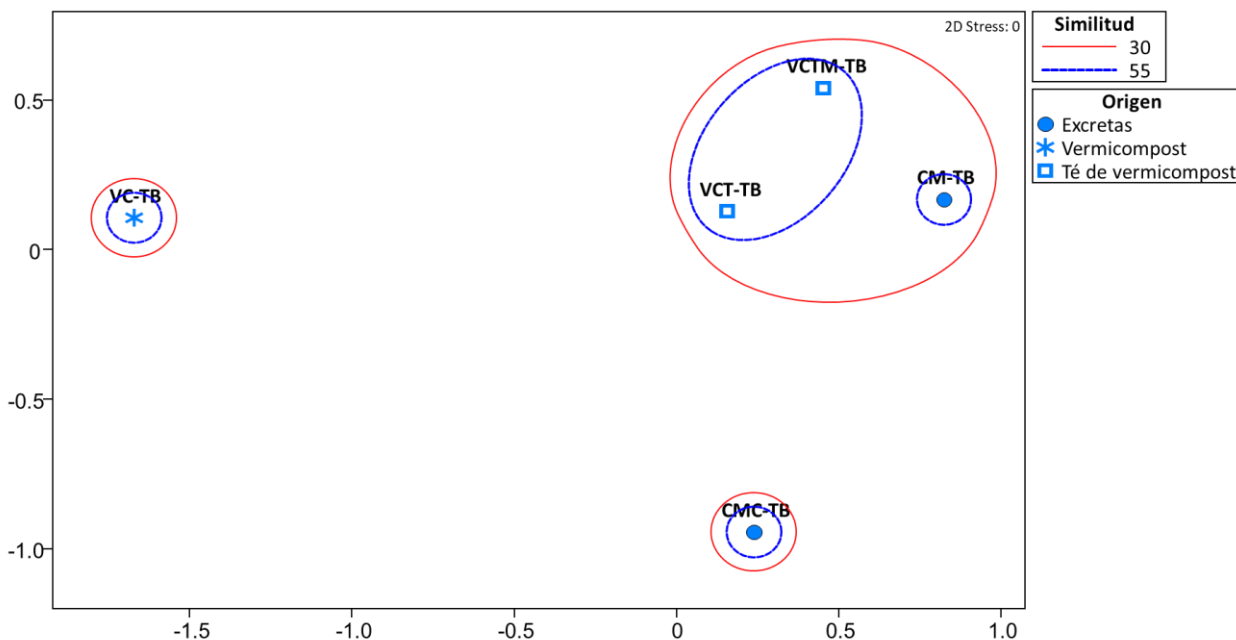


Fig. 2.5 Ordenación del escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) basada en la matriz de distancia Bray-Curtis de comunidades cultivables resistentes a 10 µg/ml de oxitetraciclina del proceso de vermicompostaje.

Los símbolos denotan el origen del inóculo utilizado en cada caldo de cultivo, y el porcentaje de similitud se muestra según el color de las líneas que rodean las muestra.

2.4 Discusión

2.4.1 Precompostaje de excretas

El precompostaje no generó cambios en las características químicas de las excretas en cuanto al pH y el contenido de N, P y K que fueron semejantes a los observados por Zamora et al., (2017) en pH y N, e inferiores en P y K.

La composición bacteriana de las excretas bovinas frescas ha sido estudiada por diversas técnicas incluyendo la secuenciación masiva, con las que, al igual que en el presente estudio, se encontró dominancia de los filos Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacterias (Huang et al., 2020; Ozbayram et al., 2018; Pandey et al., 2018; Shanks et al., 2011; Sun et al., 2015; Wong et al., 2016), aunque los filos de menor abundancia (< 4 %) variaron. A pesar de la existencia de varios estudios que analizan la estructura de la comunidad bacteriana en las excretas bovinas, este estudio representa el primer análisis comparativo de los cambios observados durante la etapa de precompostaje utilizando secuenciación masiva.

Todos los taxones con mayor abundancia en estas muestras (grupos simprof d, b, c y a) son de anaerobios obligados, anaerobios facultativos o microaerófilos habitantes del rumen de bovinos y otros rumiantes (Girija et al., 2013; Hagey et al., 2019; Kong et al., 2010; Kong et al. 2019; Mutungwazi et al., 2022; Nagao-Kitamoto et al., 2016; Pandey et al., 2018), de intestinos de humanos (Ishiguro et al., 2018) y del estiércol de bovinos y heces humanas (Durso et al., 2010; Hagey et al., 2019; Wong et al., 2016), por lo que no es sorprendente su presencia exclusiva o dominante en CM y CMC. Miembros de estos taxones cumplen un papel importante en las funciones del rumen como la degradación de la lignocelulosa (Familia Ruminococcaceae y Bacteroidaceae), y la producción de ácido acético, butírico y propanoico, a partir de la fermentación de diferentes carbohidratos, como en el caso de *Alistipes*, *Sporobacter*, *Succinivibrio Eubacterium*, Christensenellaceae, Bacteroidaceae, Lachnospiraceae y Porphyromonadaceae (Bach et al., 2019; Bryant, 2015; Dworkin et al., 2006; Durso et al., 2010; Grech-Mora et al., 2015; Hagey et al., 2019; Khan et al., 1980; Könönen et al., 2015; Mukherjee et al., 2020; Mutungwazi et al., 2022; Ozbayram et al., 2018; Wiegel et al., 2006).

Dentro de *Bacteroides*, *Treponema* y unc. Erysipelotrichaceae (que aumentaron con el precompostaje), se han reportado especies patógenas de diferentes hospederos (Bell, 2017; Ijoma et al., 2021; Verburg et al., 2014). Por otro lado, el aumento de representantes de la familia Porphyromonadaceae en la muestra precompostada, puede explicarse porque estas bacterias pueden tener un papel en la degradación anaerobia de las excretas de bovino (Ozbayram et al., 2018). Es importante notar que estos taxones que aumentaron en CMC no fueron detectados posteriormente en muestras del proceso.

El papel de los miembros de *Clostridium* en el rumen parece estar relacionado con la conversión de carbohidratos a succinato y acetato (Ijoma et al., 2021), y a la digestión de celulosa, quitina y lignocelulosa (Girija et al., 2013), lo que podría explicar la mayor abundancia de este género en las excretas frescas. Sin embargo, algunos de los ASV de este género detectados en CM son similares a secuencias de especies patógenas para animales (Manyi-Loh et al., 2016; Wong et al., 2016), y, aunque solo la mitad de estos fueron detectados en CMC, se requiere de estudios adicionales para determinar su papel ecológico en estas muestras.

Los principales cambios observados en la comunidad bacteriana durante el precompostaje fueron la reducción del filo Firmicutes, así como un aumento de Bacteroidetes y Spirochaetes. Esta variación se puede atribuir al incremento en las muestras de CMC de representantes en los géneros de alta abundancia de los filos *Bacteroides*, *Alistipes*, unc. Bacteroidaceae y *Treponema*, que pueden haberse multiplicado en el período de precompostaje, y a la colonización por bacterias presentes en el ambiente (Wong et al., 2016). Estos factores no tienen un impacto significativo en la diversidad de la muestra, lo que coincide con lo observado por Wong et al., (2016) al comparar excretas de vaca no apiladas durante el mismo período de tiempo. Estos autores también observaron un cambio de poblaciones bacterianas de anaeróbicas a aeróbicas. En contraste, en este estudio las clases Clostridia y Bacteroidia, con representantes estrictamente anaeróbicos, fueron dominantes tanto en CM como en CMC. Las diferencias pueden atribuirse al hecho de que las excretas analizadas por Wong et al., (2016) fueron recolectadas en campo, en contraste con la pila de precompostaje utilizada en este estudio, donde los anaerobios estrictos podrían sobrevivir en los micronichos creados por el volumen de la pila. También se observó una disminución de secuencias similares a coliformes entre CM y CMC, incluida *E. coli*, que solo se detectó en estiércol fresco. Además, de los ASV que aumentaron su número en CMC, solo los clasificados como *Clostridium* sobrevivieron al proceso de vermicompostaje.

2.4.2 Vermicompost

En términos generales, el pH del vermicompost obtenido a partir de excretas tiende a ser alcalino como el encontrado en este estudio, debido por un lado a la secreción de carbonato cálcico por las glándulas de Morren de la lombriz (Bollo 1999) y por otro a que las excretas presentan generalmente pH básico por liberar nitrógeno en forma de urea, que se descompone y forma amoníaco (Moreno-Caselles et al., 2002).

Cabe destacar que la alta diversidad bacteriana encontrada en el vermicompost es una característica positiva que influye en el aporte de nutrientes a la planta y en la capacidad de supresión de patógenos en cultivos (Diénez et al. 2018; Kiyasudeen et al., 2016; Mengesha et al., 2017;

Vijayabharathi et al., 2015; Vivas et al., 2009, Yattoo et al., 2021; You et al., 2019). En este estudio, VC fue, después del VCT, la muestra con mayor diversidad que fue semejante al encontrado por Lv et al., (2018) analizando también vermicompost de estiércol de vaca. Una alta proporción de esta comunidad microbiana (72 %) no fue clasificada a nivel de género o especie. Los estudios metagenómicos basados en técnicas independientes de cultivo permiten identificar microorganismos nunca cultivados para los cuales no se puede llegar a una identificación más específica (Rappé & Giovannoni, 2003), por lo que se puede especular que una alta proporción de la comunidad bacteriana del vermicompost pueden representar nueva diversidad.

Según Pathma & Sakthivel, (2012), el proceso de vermicompostaje modifica la comunidad microbiana presente en el sustrato de diversas formas relacionadas con el pasaje por el intestino de la lombriz, los autores observaron un aumento en el número de Gamaproteobacterias y Actinobacterias. Esto coincide con el incremento observado en estos taxones en el vermicompost de este estudio. Esta modificación del sustrato se refleja en la disimilitud media observada entre las comunidades de excretas y el vermicompost (87% a nivel de género).

Estudios enfocados en el vermicompostaje de excretas bovinas y otros sustratos encontraron también un predominio de Proteobacterias, seguido en abundancia por Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria (Aira et al., 2016; Cai et al., 2018; Lv et al., 2015; Yassir et al., 2009). Aunque todas las clases dentro del filo Proteobacterias aumentaron en el vermicompost (Cuadro S2.4), como lo reporta Yasir et al., (2009), los taxones con abundancia mayor al 2 % de este filo presentes en VC, unc. Steroidobacterales, unc. Cellvibrionales y unc. Betaproteobacteria, solo se han identificado a nivel de orden o clase, por lo que se tiene poco detalle de su papel en el vermicompost. Sin embargo, su abundancia en esta muestra puede indicar un papel importante en los cambios de diversidad bacteriana que se producen durante el vermicompostaje (Castillo et al., 2013). El aumento de la clase Betaproteobacteria se ha reportado previamente (Vivas et al., 2009; Castillo et al., 2013), aunque en este estudio fueron los miembros no clasificados de Betaproteobacteria los que se encontraron entre los taxones abundantes. Por otro lado, el orden Steroidobacterales incluye bacterias quimioorganoheterotróficas, Hu et al., (2020) y Hoffmann et al., (2020), sugieren que estas bacterias podrían tener un papel en la mineralización del carbono orgánico en el vermicompost. En el caso del orden Cellvibrionales, *Cellvibrio*, produce enzimas hidrolíticas (Cai et al., 2018) y se ha reportado su aumento después del pasaje por el intestino de la lombriz (Domínguez et al., 2021).

Dentro de los taxones clasificados como Bacteroidetes abundantes en el vermicompost, hay bacterias quitinolíticas como las pertenecientes a las familias Chitinophagaceae y Cytophagaceae (Hu et al., 2020), y degradadores de materia orgánica compleja del suelo (Bernard et al., 2012) que podrían degradar lignocelulosa como Flavobacteriaceae y Saprospiraceae (Cai et al., 2018). Representantes

no cultivados de estas familias han sido detectados anteriormente tanto en el intestino de *Eisenia fetida* (Pathma & Sakthivel, 2012) como en vermicompost (Cai et al., 2018; Zhang et al., 2020).

Este es el primer reporte de unc. Vicinamibacteraceae (Acidobacteria) y unc. *Saccharimonas* (Saccharibacterias) en estudios de vermicompost, aunque el filo Saccharibacteria se ha encontrado predominando en este tipo de muestras (Cai et al., 2018). Representantes de este filo juegan un papel en la degradación de varios compuestos orgánicos (Kindaichi et al., 2016).

Si bien el género *Pseudomonas* es ubicuo en diversos ambientes, Cai et al., (2018) lo encontraron en baja abundancia en muestras de vermicompost, al igual que en este estudio. Cabe destacar que se han cultivado cepas de este género a partir de vermicompost (Vijayabharathi et al., 2015) y se ha encontrado actividad de promoción de crecimiento in vitro (Prakash & Hemalatha 2013). En este estudio se observaron varias especies de este género exclusivamente en VC.

2.4.3 Té de vermicompost

Las características químicas de los té pueden variar según el sustrato utilizado, la presencia de aireación durante la preparación, el uso de aditivos como azúcares y otras variables del proceso, incluida la relación sustrato: agua utilizada (Fritz et al., 2012; Kannangara et al., 2006; Kiyasudeen et al., 2016; Kim et al., 2015; Zamora et al., 2017). En este estudio, la elusión del vermicompost para preparar el té causó una disminución de los nutrientes del VC. Esto se debe a la dilución realizada al preparar el té y a que a medida que los materiales son descompuestos por los microorganismos que los utilizan como fuente de energía, en el caso del C o para la formación de proteínas y crecimiento celular como el N, la biomasa microbiana aumenta, por lo que los contenidos de N y P disponibles se reducen al ser inmovilizados, ya que los microorganismos actúan como sumidero y fuente importante de nutrimentos como el C, N, K y P (Paul & Clark, 1996; Zamora et al., 2017). El pH del té no varió respecto al observado en VC y fue similar al reportado por Kannangara et al., (2006) y Fritz et al., (2012) en té preparados a partir de residuos vegetales.

Se atribuye a los té de vermicompost las características positivas en la salud y protección de las plantas aportadas por el vermicompost utilizado para prepararlos (Diáñez et al., 2018; Fritz et al., 2012; Kiyasudeen et al., 2016; Mengesha et al., 2017; Yattoo et al., 2021). Además, diferentes trabajos han señalado que la preparación del té hace que el número de microorganismos aumente debido tanto a la adición de oxígeno como de nutrientes (Diáñez et al., 2018; Kiyasudeen et al., 2016; Ingham, 2005; Yattoo et al., 2021). En nuestro estudio, el VCT presentó la mayor diversidad y número de lecturas (Cuadro 2.1), aunque no se utilizó en su preparación ningún aditivo. Sin embargo, a pesar de que el VCT conservó los filos y géneros de mayor abundancia en VC, lo que se podría denominar su comunidad central o “core”, en la mayoría de los casos estos géneros disminuyeron su abundancia.

Entre los taxones favorecidos por el proceso destaca el filo Firmicutes, específicamente la clase Clostridia, lo que se puede atribuir al aumento en los géneros *Romboutsia* y *Clostridium* en esta muestra con respecto a VC. La capacidad de formación de esporas puede ser la causa de que estos géneros presentes en las muestras de excretas sobrevivan al proceso de vermicompostaje (Wiegel et al., 2006) (Cuadro 2.2, Figura 2.2B) y proliferen bajo condiciones favorables para su crecimiento. Algunos *Clostridium* sp. ambientales pueden tener beneficios agroecológicos actuando como promotores de crecimiento de las plantas mediante la fijación de nitrógeno y el control de hongos fitopatógenos (Girija et al., 2013; Figueiredo et al., 2020; Pandey, 2028) por lo que su aumento en VCT puede representar una ventaja. También se observaron más ASVs clasificados como posibles especies patógenas en VCT que en VC, aunque menos que los observados en CM. Estos son *C. butyricum* y *C. neonatale*, sin embargo, el primero también tiene la capacidad de fijar N₂ (Pathma & Sakthivel, 2012) por lo que se requiere confirmar su papel en esta muestra. A pesar de que el género *Romboutsia*, se ha identificado en vermicompost y en diferentes tipos de estiércol de animales incluyendo bovinos (Mutungwazi et al., 2022), se desconocen sus funciones específicas en el tracto digestivo (Gerritsen et al., 2019).

Los Planctomycetaceae no asignados también aumentaron en VCT (Cuadro 2.3), favorecidos probablemente por el proceso de aireación. Los *Planctomyces* han sido detectados en vermicompost (Cai et al., 2018; Lv et al., 2018; Yasir et al., 2009) y la clase Planctomycetia en té de compost no aireado (Mengesha et al., 2017). Adicionalmente, la familia Planctomycetaceae ha sido reportada en intestino de *E. fetida* (Yausheva et al., 2016). No se menciona su papel en el vermicompostaje, pero la amplia distribución de las bacterias pertenecientes al filo Planctomycetes demuestra su capacidad para habitar en muchos entornos diferentes ya que pueden adaptarse a condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Muchos factores pueden afectar a su distribución, como la humedad, los niveles de oxígeno y los niveles de pH (Kaboré et al., 2020).

Con respecto a *Pseudomonas*, el género con mayor abundancia en VCT, se encontraron ASVs con similitud a cepas degradadoras de compuestos en suelos entre ellas *Pseudomonas furukawaii*, bacteria degradadora de bifenilos policlorados (Kimura et al., 2018), lo que indica su capacidad para degradar y utilizar compuestos complejos para su crecimiento y reproducción (Cai et al., 2018). Bacterias de este género se han detectado previamente en tés de vermicompost (Brinton & Droffner 1995; Mengesha et al., 2017), y se ha reportado que tés de compost con una alta población de géneros como *Pseudomonas*, mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos, ya que secretan enzimas o antibióticos que pueden impedir el desarrollo de varios patógenos de las plantas (Brinton & Droffner, 1995; Welke, 2005). Las condiciones de oxigenación en la preparación del té (Ingham 2005) pudieron causar la mayor abundancia de este género en comparación con las demás muestras.

2.4.4 Té de vermicompost suplementado con melaza

Debido a que el té con melaza es preparado bajo las mismas condiciones que el té sin aditivos, con la única diferencia la adición de la melaza, se pueden atribuir los cambios químicos y microbiológicos observados en esta muestra a la adición de este azúcar, el primero de ellos la disminución del pH de 8.1 a 6.7 (Cuadro 2.1). Zamora et al., (2017), que utilizó las mismas proporciones y sustrato que nuestro estudio, reportó un pH semejante al de VCTM para el mismo tipo de té. Khattiyaphutthimet et al., (2019) atribuyó este efecto a la influencia del pH de la melaza, sin embargo, este resultado podría ser causado por los productos de fermentación.

A pesar de que los aditivos son utilizados en la fabricación de té de vermicompost con el objetivo de aumentar de número de bacterias (Ingham, 2005; Scheuerell & Mahaffee, 2006), en este estudio la adición de melaza causó una disminución significativa en el número de lecturas de ASVs y de diversidad lo que no sucedió en el VCT sin melaza. No se encontró referencia a estudios metagenómicos de té de vermicompost suplementado con melaza para comparar nuestros resultados sobre la diversidad de este tipo de té, sin embargo, se ha establecido que los aditivos utilizados para producir té actúan como fuerzas selectivas que afectan la diversidad microbiana (Scheuerell & Mahaffee, 2002), incluyendo la fuente de carbono y el pH más bajo de la muestra VCTM.

Los cambios en la composición bacteriana de VCTM con respecto a las otras muestras llevan a una disimilitud estadística del 77% con las muestras VC-VCT, que se puede atribuir al aumento a un 92.2% de la clase Gammaproteobacterias (Cuadro S2.4). Los metabolismos encontrados en los diferentes géneros de esta clase son muy diferentes, con especies aerobias y anaerobias (obligados y facultativos), con diversas formas de obtención de nutrientes y energía (Madigan et al., 2018), sin embargo, fueron los géneros heterótrofos como *Aeromonas*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* los que dominaron la población bacteriana del té suplementado con melaza (Cuadro 2.2, Figura 2.2C). En el caso de *Pseudomonas*, a pesar de tener las mismas secuencias observadas en VC y VCT, el aumento de abundancia de este género en VCTM se debe al incremento de ASVs similares a especies entomopatógenas, metabólicamente versátiles y degradadoras de xenobióticos (He et al., 2012; Vodovar et al., 2006) como *P. enthomopila* y *P. linyingensis*.

El género *Acinetobacter* es ubicuo en diversos ambientes, y en el entorno agrícola esta bacteria se ha encontrado en excretas de vacas lecheras, compost, vermicompost, té de vermicompost e intestino de *E. fetida* (Fritz et al., 2012; Girija et al., 2013; Pandey et al., 2018; Perez-Perez et al., 2018), cepas de este género se consideran beneficiosas, asociadas con la actividad promotora del crecimiento de las plantas, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, y degradación de contaminantes (Girija et al., 2013; Gulati et al., 2010). Sin embargo, aunque se reconoce su potencial celulolítico y antagonismo hacia los patógenos de las plantas (Karthika et al., 2020; Pathma &

Sakthivel, 2013), se requieren más análisis dependientes del cultivo para identificar el papel de los ASV clasificados como *A. johnsonii* y *A. baumannii*, que también presentan alta homología con bacterias endófitas de estudios de rizosfera, suelos contaminados, sedimentos, intestinos de peces y plantas de tratamiento de agua en el Genbank (MH448106, MH713425, MH636837). Además, se ha informado sobre la actividad celulolítica de cepas del patógeno *A. baumannii* (Karthika et al., 2020).

Al igual que el género *Pseudomonas*, las secuencias clasificadas como *Aeromonas* fueron exclusivas de las muestras de vermicompost. *Aeromonas* es un género de bacterias ubicuas, consideradas autóctonas de los entornos acuáticos, con importancia como patógenos humanos, animales y alimentarios (Grilo et al., 2020; Janda & Abbott, 2010). En muestras relacionadas con el vermicompostaje, *Aeromonas* ha sido reportada en vermicompost (Blomström et al., 2016), en el intestino de lombrices y *E. fetida* (Furlong et al., 2002; Liu et al., 2011; Mark & Cooper, 1977; Perez-Perez et al., 2018; Wüst et al., 2011) y otras lombrices. Además, grupos filogenéticos específicos de *A. hydrophila* han sido detectados en el intestino de *E. fetida* (Toyota & Kimura, 2000). Este parece ser el caso de ASVs presentes en este estudio, como *A. media* ASV-2063, ya que se encontró similitud con secuencias de cepas encontradas en *E. fetida* (Perez-Perez et al., 2018) y fue detectada además en alta abundancia en intestinos de lombrices del sistema de vermicompostaje de este estudio (datos no presentados), así como otras secuencias de *Aeromonas* de intestino de lombrices de tierra (Liu et al., 2011). Sin embargo, la similitud de algunos ASVs con accesiones del Genbank que portan determinantes de resistencia a diferentes antimicrobianos (Figueira et al., 2011; Tacão et al., 2012), y la dominancia de secuencias de *Aeromonas* en el VCTM, alerta sobre el papel de este tipo de enmienda en la diseminación de resistencia a antibióticos (Grilo et al., 2020). Se requieren más estudios para determinar el papel de las *Aeromonas* en este sistema.

Hasta el momento, los estudios microbiológicos se han enfocado en la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en el té y el efecto de la adición de melaza (Duffy et al., 2004; Giacomini, 2012; Ingham, 2005; Kannagara et al., 2006), lo que ha llevado a cuestionar el uso de carbohidratos como aditivos debido a su potencial de promover el crecimiento de microorganismos no deseables especialmente patógenos que podrían transferirse a los cultivos alimentarios (Kiyasudeen et al., 2016). En este estudio no se detectó la presencia de *E. coli* y *Salmonella* en TVCM, a pesar de que *E. coli* si fue encontrada en las excretas frescas, y otros coliformes como *Citrobacter* y *Enterobacter* no sobrepasaron el 0.5 % de la abundancia (Cuadro S2.2).

Los aditivos utilizados para producir té de compost actúan como fuerzas selectivas que afectan la diversidad microbiana (Scheuerell & Mahaffee, 2002). La adición de melaza en este estudio, modifico químicamente al té, particularmente en el pH, y causó un cambio drástico en la diversidad, composición y abundancia de la comunidad, favoreciendo el crecimiento de bacterias capaces de

metabolizar esta sustancia, como es el caso del género *Aeromonas*. Esto indica que se debe analizar mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo los tés suplementados con melaza, no solamente para confirmar la presencia de patógenos, sino para estudiar en detalle el papel de este abono en la transmisión de determinantes de resistencia a antibióticos, y de bacterias promotoras de crecimiento para obtener una visión más completa de su inocuidad y funcionalidad, lo que

2.4.5 Análisis de comunidades cultivables resistentes presentes en el proceso de vermicompostaje

El uso de antibióticos en animales de granja como promotores del crecimiento o como medios inespecíficos de prevención y tratamiento de infecciones ha impulsado el consumo de antibióticos y la resistencia entre las bacterias del hábitat animal (Economou & Gousia, 2015; Virlo, et al., 2022). En este estudio se encontró crecimiento en caldo suplementado con 10 µg/ml de oxitetraciclina, a partir de muestras del proceso de vermicompostaje de excretas de vaca y en los tés de vermicompost. Al igual que el capítulo anterior, se utilizó esta concentración para seleccionar bacterias resistentes ambientales, considerando que los microorganismos de origen ambiental están expuestos a concentraciones mucho menores que bacterias clínicas, que también generan resistencia en el entorno natural (Nogrado et al., 2021; Popowska et al., 2012; Sandegren, 2014).

La muestra de excretas frescas fue la que presentó mayor cantidad de ASVs y géneros de bacterias resistentes, siendo la mayoría de estos taxones reportados en la microbiota normal de rumen y excretas (Girija et al., 2013; Manyi-Loh et al., 2016). La presencia de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos en excretas de ganado se ha reportado anteriormente, incluyendo la resistencia a tetraciclina (Kobashi et al., 2007; Virlo, et al., 2022), lo que coincide con los datos de este estudio, ya que el ganado bovino de leche es sometido a tratamientos terapéuticos donde la tetraciclina es uno de los antibióticos aprobados (Carmona y Vindas, 2008). Por otro lado, a pesar de que los animales en tratamiento son separados, el manejo de las excretas es el mismo, y puede llegar al proceso de vermicompostaje y seguir el mismo camino que las excretas de animales no medicados. Por otro lado, la leche de animales tratados debe ser retirada de la producción diaria según las indicaciones del producto utilizado, debido a que residuos de antibióticos es penalizado en las empresas que industrializan la leche, no así, los productores artesanales, que comercializan sus productos de manera personalizada.

La presencia de ASVs como *Escherichia-Shiguella*, *Aeromonas sanarellii*, *Acinetobacter colistiniresistens*, *Proteus hauseri* y *Streptococcus* sp. se debe estudiar con mayor detalle, ya que la abundancia de estos supera el 1 % en la muestra CM-TB y son potenciales patógenos presentes en el

sistema productivo. Otra bacteria abundante en esta muestra fue *Kurthia massiliensis*, bacteria Gram positiva normalmente encontrada en heces. *Kurthia* ha sido reportada anteriormente en cultivos suplementados con tetraciclina, en heces de cerdos y pollos en granjas de producción (Kobashi et al., 2007).

La disminución del número de bacterias presentes en los caldos con oxitetraciclina en la muestra precompostada puede deberse a que la mayoría de los géneros resistentes en CM-TB son bacterias anaerobias estrictas de la comunidad ruminal, como *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Alloprevotella*, y algunos de ellos no sobreviven bajo las condiciones aerobias del precompostaje. Además, en el transcurso de los 15 días de ese proceso se puede favorecer la selección de microorganismos colonizadores provenientes del ambiente. La etapa del precompostaje se utiliza para disminuir posibles patógenos y sustancias tóxicas en las excretas que podrían afectar las lombrices, mediante un proceso termofílico que afecta la comunidad microbiana presente en las excretas (Mupondi et al., 2011), que también puede influir negativamente en las bacterias resistentes presentes en las excretas frescas.

En este estudio, el vermicompost mostró la menor cantidad de géneros y ASVs resistentes de todas las muestras. La disminución de bacterias resistentes y genes de resistencia mediante el proceso de vermicompostaje ha sido reportada anteriormente (Cui et al., 2018; Huang et al., 2018; Wang et al., 2019). Esta atenuación se ha asociado con la disminución de la abundancia y la actividad bacteriana causada por la lombriz (Cui et al., 2018), con factores ambientales y cambios en la composición de la comunidad bacteriana de las excretas durante el vermicompostaje (Huang et al., 2018). A pesar de eso, de los tres géneros identificados, *Myroides* fue el de mayor abundancia en VC-TB. Representantes de este género han sido encontrado en intestinos de insectos, ambientes acuáticos y también se ha descrito en vermicompost (Dominguez et al. 2021). Estas bacterias se clasifican también como patógenos oportunistas poco frecuentes y, en China, se han reportado aislamientos resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles (Hu et al., 2016), por lo que es conveniente continuar estudiando su presencia en el vermicompost.

El proceso de preparación de los téis de vermicompost provocó el aumento de los ASVs resistentes a oxitetraciclina con respecto al VC-TB, y además favoreció el crecimiento de diversas especies de *Acinetobacter* y *Aeromonas*, bacterias que ya se encontraban de forma abundante en las muestras crudas correspondientes a VCT-TB y VCTM-TB. *Acinetobacter* es un género ubicuo en la naturaleza que contiene especies oportunistas y patógenos como *A. baumannii*. Además, se han aislado cepas de esta especie resistentes a carbapenem a partir de vegetales (Adewoyin & Okoh, 2018), por lo que la presencia de *Acinetobacter* resistente a tetraciclina en los téis de vermicompost podría resultar en la diseminación de esta resistencia a productos de consumo humano.

Como se discutió anteriormente, los ASVs clasificados como *Aeromonas* tienen similitud con accesiones de ambientes acuáticos e intestinos de diferentes animales o infecciones de peces, ya que *Aeromonas* también es un género ubicuo en diferentes hospederos en la naturaleza, y es también habitante del intestino de *Eisenia* (Perez-Perez et al., 2018). Los ASVs resistentes de este género tienen el mismo patrón de similitud con estas accesiones y con un estudio de un transposón Tn6433 que acelera la diseminación de tet(E) en *Aeromonas* de un biofilm aeróbico bajo estrés de oxitetraciclina (MK656380), además de otras secuencias de estudios de resistencia a antibióticos. Debido a la abundancia de este género en la muestra cruda de té y en el caldo con antibióticos de todas las muestras menos VC-TB, se podría especular que niveles subinhibitorios de tetraciclina, podrían estar presentes de manera constante en este sistema de producción intensivo, lo que seleccionaría especies de este género con capacidad de adquirir genes de resistencia y sobrevivir en diversos ambientes, y en el intestino de *Eisenia* (Grilo et al., 2020; Janda & Abbott, 2010; Toyota & Kimura, 2000).

El presente capítulo proporciona evidencia de la sucesión de diferentes comunidades bacterianas durante el proceso de vermicompostaje, incluido el precompostaje de estiércol y los té de compost, y de la presencia de bacterias resistentes a oxitetraciclina en diferente abundancia en este proceso. Las bacterias que habitan en el rumen y el estiércol fueron reemplazadas por una comunidad diversa de degradadores de quitina, lignocelulosa y otros compuestos orgánicos complejos en el vermicompost y el té de vermicompost, y posteriormente por un grupo escasamente diverso de géneros de gamma-proteobacterias en el té suplementado con melaza. Estos cambios de comunidades bacterianas podrían estar afectando las bacterias resistentes en el caso de las excretas precompostadas y el vermicompost. La diversidad taxonómica bacteriana generada durante el vermicompostaje de las excretas puede relacionarse con atributos benéficos de este fertilizante como la supresión de enfermedades y la promoción del crecimiento vegetal, cuya comunidad “core” se mantiene en el té no suplementado. La adición de melaza al té redujo sustancialmente la riqueza y diversidad de ASV, lo que provocó un aumento de bacterias de los géneros *Aeromonas* y *Acinetobacter*, y ASVs de estos géneros fueron detectados en caldos suplementados con oxitetraciclina, lo que da la posibilidad de ser agentes de diseminación de genes de resistencia al ambiente. Se necesitan más estudios para evaluar la inocuidad de los té de vermicompost con y sin aditivos y el papel de su microbioma en la promoción del crecimiento de las plantas y la supresión de enfermedades.

2.5 Bibliografía

- Adewoyin, M. A., & Okoh, A. I. (2018). The natural environment as a reservoir of pathogenic and non-pathogenic *Acinetobacter* species. *Reviews on environmental health*, 33(3), 265-272.
- Aira, M., Monroy, F., & Domínguez, J. (2007). Microbial biomass governs enzyme activity decay during aging of worm-worked substrates through vermicomposting. *Journal of Environmental Quality*, 36(2), 448-452.
- Aira, M., Bybee, S., Pérez-Losada, M., & Domínguez, J. (2015). Feeding on microbiomes: effects of detritivory on the taxonomic and phylogenetic bacterial composition of animal manures. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11).
- Aira, M., J. Olcina, M. Pérez-Losada, J. Domínguez. (2016). Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates. *Appl. Soil Ecol.*, 98, pp. 103-111.
- Al-Mughrabi, KI; Bertheleme, C; Livingston, T; Burgoyne, A; Poirier, R; Vikram, A. (2008). Aerobic compost tea, compost and a combination of both reduce the severity of common Scab (*Streptomyces scabiei*) on Potato tubers. *Journal of Plant Sciences* 3(2):168-175.
- Arancon, NQ; Edwards, CA; Dick, R; Dick, L. (2007). Vermicompost tea production and plant growth impacts. *Biocycle* 48:51-52. <https://www.biocycle.net/vermicompost-tea-production-and-plant-growth-impacts/>. Accesado en junio del 2022
- Arancon, N. Q., Owens, J. D., & Converse, C. (2019). The effects of vermicompost tea on the growth and yield of lettuce and tomato in a non-circulating hydroponics system. *Journal of plant nutrition*, 42(19), 2447-2458.
- Artavia, S; Uribe, L; Saborío, F; Arauz, LF; Castro, L. (2010). Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de tiquizque (*Xanthosoma sagittifolium*). *Agronomía Costarricense* 34(1):17-29.
- Aust, M. O., Godlinski, F., Travis, G. R., Hao, X., McAllister, T. A., Leinweber, P., et al. (2008). Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle. *Environ. Pollut.* 156, 1243–1251.
- Bach, A., López-García, A., González-Recio, O., Elcoso, G., Fàbregas, F., Chaucheyras-Durand, F., & Castex, M. (2019). Changes in the rumen and colon microbiota and effects of live yeast dietary supplementation during the transition from the dry period to lactation of dairy cows. *Journal of dairy science*, 102(7), 6180-6198.
- Bell, J. (2017). Identifying infection reservoirs of digital dermatitis in dairy cattle. The University of Liverpool (United Kingdom).

- Berg, G., & Martinez, J. L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex? *Frontiers in microbiology*, 6, 241.
- Bernard, L., Chapuis-Lardy, L., Razafimbelo, T., Razafindrakoto, M., Pablo, A. L., Legname, E., ... & Blanchart, E. (2012). Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. *The ISME journal*, 6(1), 213-222.
- Black, Z., Balta, I., Black, L., Naughton, P. J., Dooley, J. S., & Corcionivoschi, N. (2021). The fate of foodborne pathogens in manure treated soil. *Frontiers in Microbiology*, 12, 781357.
- Blomström, A. L., Lalander, C., Komakech, A. J., Vinnerås, B., & Boqvist, S. (2016). A metagenomic analysis displays the diverse microbial community of a vermicomposting system in Uganda. *Infection ecology & epidemiology*, 6(1), 32453.
- Bollo E. (1999). Lombricultura: una alternativa de reciclaje. *Soboc Grafic*, Quito
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, 37(8), 852-857.
- Bryant, M. P. (2015). "Succinivibrio," in *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, ed W. B. Whitman (New York, NY: John Wiley & Sons, Ltd). 581–586.
- Cai, L., Gong, X., Sun, X., Li, S., & Yu, X. (2018). Comparison of chemical and microbiological changes during the aerobic composting and vermicomposting of green waste. *PloS one*, 13(11), e0207494.
- Calderón, J. (1992). Determinación de residuos de sustancias inhibitorias en leche bovina no pausterizada. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional, Costa Rica].
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, and Holmes SP. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 13:581–583.
- Carmona, G. & Vindas, S. (2008). Uso racional de medicamentos veterinarios en ganado bovino. Consultado el 1 de agosto 2022. Disponible en: https://images.engormix.com/s_articles/carmonasolano_medicamentos.pdf
- Casey, J. A., F. C. Curriero, S. E. Cosgrove, K. E. Nachman, and B. S. Schwartz. 2013. High-density livestock operations, crop field application of manure, and risk of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, Pennsylvania, USA. *JAMA Intern. Med.* 173:1980–1990.
- Carrel, M., Schweizer, M. L., Sarrazin, M. V., Smith, T. C., & Perencevich, E. N. (2014). Residential proximity to large numbers of swine in feeding operations is associated with increased risk of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization at time of hospital admission in rural Iowa veterans. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(2), 190-192.
- Castello, P; Celano, G; Zaccardelli, M. (2014). Metabolic patterns of bacterial communities in aerobic compost teas associated with potential biocontrol of soilborne plant diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2):277-286.
- Castillo, J. M., Romero, E., & Nogales, R. (2013). Dynamics of microbial communities related to biochemical parameters during vermicomposting and maturation of agroindustrial lignocellulose wastes. *Bioresource technology*, 146, 345-354.
- CLSI (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 27th ed. CLSI Supplement M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Chun, J., Kim, K. Y., Lee, J. H., & Choi, Y. (2010). The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC microbiology*, 10(1), 1-8.
- Clarke KR, Gorley RN (2015) PRIMER v7: User Manual/Tutorial, PRIMER-E, Plymouth, 296pp.
- de Gannes V, Eudoxie G, HickeyWJ (2013) Prokaryotic successions and diversity in composts as revealed by 454-pyrosequencing. *Bioresour Technol* 133:573–580.
- Diáñez, F., Marín, F., Santos, M., Gea, F. J., Navarro, M. J., Piñeiro, M., & González, J. M. (2018). Genetic Analysis and In Vitro Enzymatic Determination of Bacterial Community in Compost Teas from Different Sources. *Compost Science & Utilization*, 1-15.
- Domínguez, J., Aira, M., Crandall, K. A., & Pérez-Losada, M. (2021). Earthworms drastically change fungal and bacterial communities during vermicomposting of sewage sludge. *Scientific Reports*, 11(1), 15556.
- Duffy, B., Sarreal, C., Ravva, S., & Stanker, L. (2004). Effect of molasses on regrowth of *E. coli* O157: H7 and Salmonella in compost teas. *Compost science & utilization*, 12(1), 93-96.
- Durso, L. M., Harhay, G. P., Smith, T. P., Bono, J. L., DeSantis, T. Z., Harhay, D. M., ... & Clawson, M. L. (2010). Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4858-4862.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.). (2006). *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer-Verlag.
- Eastman B.R., Kane P.N., Edwards C.A. Trytek L., Gunadi B., Stermer A.L., Mobley J.R. 2001. The effectiveness of vermiculture in human pathogen reduction for USEPA biosolids stabilization. *Compost Science and utilization* 9:38-49.
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and drug resistance*, 8, 49.

- FAO, (2021). El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2021-2025. Roma.
- Fernández-Gomez MJ, Nogales R, Insam H, Romero E, Goberna M (2010) Continuous-feeding vermicomposting as a recycling management method to revalue tomato-fruit wastes from greenhouse crops. *Waste Manage* 30(12):2461–2468
- Ferruzi C. 1994. Manual de Lombricultura. Mundi-Prensa, Madrid.137p.
- Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., & Manaia, C. M. (2011). Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water research*, 45(17), 5599-5611.
- Figueiredo, G. G. O., Lopes, V. R., Romano, T., & Camara, M. C. (2020). Clostridium. In Beneficial Microbes in Agro-Ecology (pp. 477-491). Academic Press.
- Fritz, JI; Franke-Whittle, IH; Haindl, S; Insam, H; Braun, R. (2012). Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. *Canadian journal of microbiology* 58(7):836-847.
- Furlong M.A. Singleton D.R., Coleman D.C., Whitman W.B. 2002. Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1265-1279.
- Gerritsen, J., Hornung, B., Ritari, J., Paulin, L., Rijkers, G. T., Schaap, P. J., ... & Smidt, H. (2019). A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. *BioRxiv*, 845511.
- Giacomini, D. G. Formal recommendation by the National organic Standard Board (NOSB) to the National Organic Program (NOP). (2012). US Department of Agriculture: USA.
- Girija, D., Deepa, K., Xavier, F., Antony, I., & Shidhi, P. R. (2013). Analysis of cow dung microbiota—a metagenomic approach. *Indian J of Biotechnol*, 12, 372-378
- Gómez-Brandon, M., Aira, M., Lores, M., & Domínguez, J. (2011). Epigeic earthworms exert a bottleneck effect on microbial communities through gut associated processes. *PloS one*, 6(9), e24786.
- Gómez-Brandón M., Aira M., Domínguez J. (2020). Vermicomposts are biologically different: microbial and functional diversity of green vermicomposts. In: Bhat S.A. et al. (Eds). Earthworm Assisted Remediation of Effluents and Wastes. Springer Nature, Singapur, pp. 150-170
- Granados-Chinchilla, F., & Rodríguez, C. (2014). Bioavailability of in-feed tetracyclines is influenced to a greater extent by crude protein rather than calcium. *Animal Feed Science and Technology*, 198, 323-332.

- Grech-Mora, I., Fardeau, M. L., Garcia, J. L., & Ollivier, B. (2015). Sporobacter. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-6.
- Grilo, M. L., Sousa-Santos, C., Robalo, J., & Oliveira, M. (2020). The potential of *Aeromonas* spp. from wildlife as antimicrobial resistance indicators in aquatic environments. *Ecological Indicators*, 115, 106396.
- Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V., Prasad, R., 2010. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Arch. Microbiol.* 192, 975–983
- Gupta, K. K., Aneja, K. R., & Rana, D. (2016). Current status of cow dung as a bioresource for sustainable development. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), 1-11.
- Gutiérrez, K., Alfaro, M., Granados, F., Sánchez, J., García, F., & Rodríguez, C. (2010). Detección de tetraciclinas en nueve lotes de alimentos para cerdos, tilapias y pollos producidos en Costa Rica: incumplimiento de normativas y disconformidades con el etiquetado oficial de garantía. *Agronomía Costarricense*, 34(2), 145-151.
- Hagey, J. V., Bhatnagar, S., Heguy, J. M., Karle, B. M., Price, P. L., Meyer, D., & Maga, E. A. (2019). Fecal microbial communities in a large representative cohort of California dairy cows. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1093.
- He, W. H., Wang, Y. N., Du, X., Zhou, Y., Jia, B., Bian, J., ... & Chen, G. C. (2012). *Pseudomonas linyingensis* sp. nov.: a novel bacterium isolated from wheat soil subjected to long-term herbicides application. *Current microbiology*, 65(5), 595-600.
- He Y, Xie K, Xu P, Huang X, GuW, Zhang F, Tang S (2013) Evolution of microbial community diversity and enzymatic activity during composting. *Res Microbiol* 164(2):189–198.
- Hoffmann K, Bienhold C, Buttigieg PL, Knittel K, Laso-Perez R, Rapp JZ, Boetius A, Offre P (2020) Diversity and metabolism of Woeseiales bacteria, global members of marine sediment communities. *ISME J* 14: 1042–1056.
- Hu, S. H., Yuan, S. X., Qu, H., Jiang, T., Zhou, Y. J., Wang, M. X., & Ming, D. S. (2016). Antibiotic resistance mechanisms of *Myroides* sp. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 17(3), 188-199.
- Hu, J., Zhao, H., Wang, Y., Yin, Z., & Kang, Y. (2020). The bacterial community structures in response to the gut passage of earthworm (*Eisenia fetida*) feeding on cow dung and domestic sludge: Illumina high-throughput sequencing-based data analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110149.

- Huang K, Li F, Wei Y, Chen X, Fu X (2013) Changes of bacterial and fungal community compositions during vermicomposting of vegetable wastes by *Eisenia foetida*. *Bioresource technology* 150:235–241
- Huang, K., Xia, H., Wu, Y., Chen, J., Cui, G., Li, F., ... & Wu, N. (2018). Effects of earthworms on the fate of tetracycline and fluoroquinolone resistance genes of sewage sludge during vermicomposting. *Bioresource technology*, 259, 32-39.
- Huang, S., Ji, S., Wang, F., Huang, J., Alugongo, G. M., & Li, S. (2020). Dynamic changes of the fecal bacterial community in dairy cows during early lactation. *AMB Express*, 10(1), 1-9.
- Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel MG, Heck ME, et al. 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. antimicrob.* 5:26.
- Ijoma, G. N., Nkuna, R., Mutungwazi, A., Rashama, C., & Matambo, T. S. (2021). Applying PICRUSt and 16S rRNA functional characterisation to predicting co-digestion strategies of various animal manures for biogas production. *Scientific reports*, 11(1), 1-13
- Ingham, E. (2005). The compost tea brewing manual (Vol. 728). Corvallis, OR, USA: Soil Foodweb Incorporated.
- Ishiguro, E., Haskey, N., & Campbell, K. (2018). Gut Microbiota Throughout the Lifespan. *Gut Microbiota*, 41-55.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2010. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 35e73 b
- Kaboré, O. D., Godreuil, S., & Drancourt, M. (2020). Planctomycetes as host-associated bacteria: a perspective that holds promise for their future isolations, by mimicking their native environmental niches in clinical microbiology laboratories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 519301.
- Kannangara, T., Forge, T., & Dang, B. (2006). Effects of aeration, molasses, kelp, compost type, and carrot juice on the growth of *Escherichia coli* in compost teas. *Compost science & utilization*, 14(1), 40-47.
- Khan, A. W., Saddler, J. N., Patel, G. B., Colvin, J. R., & Martin, S. M. (1980). Degradation of cellulose by a newly isolated mesophilic anaerobe, Bacteroidaceae family. *FEMS Microbiology Letters*, 7(1), 47-50.
- Karthika, A., Seenivasagan, R., Kasimani, R., Babalola, O. O., & Vasanthi, M. (2020). Cellulolytic bacteria isolation, screening and optimization of enzyme production from vermicompost of pper cup waste. *Waste Management*, 116, 58-65.

- Khattiyaphutthimet, N., Chuasavathi, T., & Iwai, C. B. (2019). Nutrient dynamic of vermicompost tea after adding molasses and oxygen. *International Journal of Environmental and Rural Development*, 10(1), 6-9.
- Kim, M. J., Shim, C. K., Kim, Y. K., Hong, S. J., Park, J. H., Han, E. J., ... & Kim, S. C. (2015). Effect of aerated compost tea on the growth promotion of lettuce, soybean, and sweet corn in organic cultivation. *The plant pathology journal*, 31(3), 259.
- Kimura, N., Watanabe, T., Suenaga, H., Fujihara, H., Futagami, T., Goto, M., ... & Hirose, J. (2018). *Pseudomonas furukawaii* sp. nov., a polychlorinated biphenyl-degrading bacterium isolated from biphenyl-contaminated soil in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(5), 1429-1435.
- Kindaichi, T., Yamaoka, S., Uehara, R., Ozaki, N., Ohashi, A., Albertsen, M., ... & Nielsen, J. L. (2016). Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. *FEMS microbiology ecology*, 92(6).
- Kiyasudeen, S.K., Ibrahim, M.H., Quaik, S., Ismail, A.. (2016). Vermicompost, Its Applications and Derivatives. In *Prospects of Organic Waste Management and the Significance of Earthworms* (pp. 201-230). Springer, Cham.
- Kobashi, Y., Hasebe, A., Nishio, M., & Uchiyama, H. (2007). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from various agricultural environments. *Microbes and environments*, 22(1), 44-51.
- Kong, Y., Teather, R., & Forster, R. (2010). Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS microbiology ecology*, 74(3), 612-622.
- Kong, L. C., Wang, B., Wang, Y. M., Hu, R. G., Atiewin, A., Gao, D., ... & Ma, H. X. (2019). Characterization of bacterial community changes and antibiotic resistance genes in lamb manure of different incidence. *Scientific reports*, 9(1), 1-7.
- Könönen, E., Song, Y., Rautio, M., & Finegold, S. M. (2015). Alistipes. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-7.
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic pollution in the environment: from microbial ecology to public policy. *Microorganisms*, 7(6), 180.
- Kumar, K, Gupta, SC, Chander, Y, Singh, K. 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87: 1-53.
- Lazcano, C., Gómez-Brandón, M., & Domínguez, J. (2008). Comparison of the effectiveness of composting and vermicomposting for the biological stabilization of cattle manure. *Chemosphere*, 72(7), 1013-1019.

- Li, Z., Chen, C., Zhang, K., Zhang, Z., Zhao, R., Han, B., ... & Ding, Y. (2022). Response of Antibiotic Resistance Genes and Related Microorganisms to Arsenic during Vermicomposting of Cow Dung. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), 14475.
- Li Q, Wang XC, Zhang HH, Shi HL, Hu T, Ngo HH (2013). Characteristics of nitrogen transformation and microbial community in an aerobic composting reactor under two typical temperatures. *Bioresour Technol* 137:270–277.
- Liu, D., Lian, B., Wang, B., & Jiang, G. (2011). Degradation of potassium rock by earthworms and responses of bacterial communities in its gut and surrounding substrates after being fed with mineral. *PLoS One*, 6(12), e28803.
- Lv, B., Xing, M., & Yang, J. (2018). Exploring the effects of earthworms on bacterial profiles during vermicomposting process of sewage sludge and cattle dung with high-throughput sequencing. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.
- Madigan, MT, Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. 2018. Brock Biology of Microorganisms. 15th ed New York. Pearson. 1022 p.
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Makaka, G., Simon, M., & Okoh, A. I. (2016). An overview of the control of bacterial pathogens in cattle manure. *International journal of environmental research and public health*, 13(9), 843.
- Mengesha, W. K., Powell, S. M., Evans, K. J., & Barry, K. M. (2017). Diverse microbial communities in non-aerated compost teas suppress bacterial wilt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 1-14.
- Moreno-Caselles, J; Moral, R; Perez-Murcia, R; Perez-Espinosa, A; Rufete, B. (2002). Nutrient value of animal manures in front of environmental hazards. *Communications In Soil Science And Plant Analysis* Vol. 33(15-18): 3023-3032.
- Mukherjee, A., Lordan, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Gut microbes from the phylogenetically diverse genus *Eubacterium* and their various contributions to gut health. *Gut Microbes*, 12(1), 1802866.
- Mupondi, L. T., Mnkeni, P. N., & Muchaonyerwa, P. (2011). Effects of a precomposting step on the vermicomposting of dairy manure-waste paper mixtures. *Waste Management & Research*, 29(2), 219-228.
- Mutungwazi, A., Ijoma, G. N., Ogola, H. J., & Matambo, T. S. (2022). Physico-Chemical and Metagenomic Profile Analyses of Animal Manures Routinely Used as Inocula in Anaerobic Digestion for Biogas Production. *Microorganisms*, 10(4), 671.

- Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto, S., Kuffa, P., & Kamada, N. (2016). Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intestinal research*, 14(2), 127.
- Nogradio, K., Unno, T., Hur, H. G., & Lee, J. H. (2021). Tetracycline-resistant bacteria and ribosomal protection protein genes in soils from selected agricultural fields and livestock farms. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 1-9.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Resistencia a los antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Oliver, J. P., Gooch, C. A., Lansing, S., Schueler, J., Hurst, J. J., Sassoubre, L., ... & Aga, D. S. (2020). Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems. *Journal of dairy science*, 103(2), 1051-1071.
- Ozbayram, E. G., Ince, O., Ince, B., Harms, H., & Kleinstaubler, S. (2018). Comparison of rumen and manure microbiomes and implications for the inoculation of anaerobic digesters. *Microorganisms*, 6(1), 15.
- Pandey, P., Chiu, C., Miao, M., Wang, Y., Settles, M., Del Rio, N. S., ... & Jeannotte, R. (2018). 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. *PloS one*, 13(1).
- Pant, A., Radovich, T.J.K., Hue, N.V. and Paull, R.E. (2012). Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth. *Sci. Hortic.*, 148: 138–46.
- Partanen P, Hultman J, Paulin L, Auvinen P, Romantschuk M (2010) Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol* 10:94
- Pathma, J., & Sakthivel, N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus*, 1(1), 1-19.
- Pathma J, Sakthivel N (2013) Molecular and functional characterization of bacteria isolated from straw and goat manure based vermicompost. *Appl Soil Ecol* 70:33–47
- Paul, E.; Clark, F. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. 2 ed. San Diego, CA, USA, Academic Press. 340 p.
- Perez-Perez, J. Abraham; Espinosa-Victoria, David; Silva-Rojas, Hilda V. y Lopez-Reyes, Lucía. Diversidad de la microbiota bacteriana cultivable del tracto digestivo de *Eisenia fetida*. *Rev. fitotec. mex* [online]. 2018, vol.41, n.3, pp.255-264. Epub 30-Sep-2020. ISSN 0187-7380.
- Popowska, M., Rzczycka, M., Miernik, A., Krawczyk-Balska, A., Walsh, F., & Duffy, B. (2012). Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(3), 1434-1443.
- Prakash M. & Hemalatha N (2013) Dynamics of Microorganisms during vermi-stabilization of

- organic substrates and enhances performance of plant growth promoting rhizobacteria on black gram. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2:171–187
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., and Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), D590-D596.
- Rappé, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual review of microbiology*, 57(1), 369-394.
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Upsala journal of medical sciences*, 119(2), 103-107.
- Scheuerell, S. J. & Mahaffee, W. F. (2002). Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science and Utilization* 10(4):313-338.
- Scheuerell S. J. & Mahaffee WF (2006) Variability associated with suppression of gray mold (*Botrytis cinerea*) on Geranium by foliar applications of nonaerated and aerated compost teas. *Plant Dis* 90:1201–1208.
- Shanks, O. C., Kelty, C. A., Archibeque, S., Jenkins, M., Newton, R. J., McLellan, S. L., ... & Sogin, M. L. (2011). Community structures of fecal bacteria in cattle from different animal feeding operations. *Applied and environmental microbiology*, 77(9), 2992-3001.
- Silbergeld, E. K., Graham, J. & Price L. B. (2008). Industrial Food Animal Production, Antimicrobial Resistance, and Human Health. *Annual review of public health*, 29:151-169.
- Somerfield, P. J., & Clarke, K. R. (2013). Inverse analysis in non-parametric multivariate analyses: distinguishing groups of associated species which covary coherently across samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 449, 261-273.
- Sun, L., Pope, P. B., Eijsink, V. G., & Schnürer, A. (2015). Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. *Microbial biotechnology*, 8(5), 815-827.
- Swati, A., & Hait, S. (2018). A comprehensive review of the fate of pathogens during vermicomposting of organic wastes. *Journal of environmental quality*, 47(1), 16-29.
- Székely, A. J., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajdú, C., & Márialigeti, K. (2009) DGGE and T-RFLP analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided T-RFLP profile of mature compost. *Microb Ecol* 57(3):522–533
- Tacão, M., Correia, A., & Henriques, I. (2012). Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla CTX-M-like genes. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4134-4140.

- Tortós, C. L., Correa, M. T., & Guerra, H. C. (2006). Estudio sobre el manejo de antibióticos en hatos lecheros artesanales de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 24(1), 91-106.
- Toyota, K., & Kimura, M. (2000). Microbial community indigenous to the earthworm *Eisenia foetida*. *Biology and fertility of soils*, 31(3), 187-190.
- Uribe L., Arauz L. F., Mata M., Meneses G., Castro L. (2009). Efecto del vermicompostaje sobre las poblaciones de *Colletotrichum acutatum* y *Pectobacterium carotovorum* presentes en residuos de plantas. *Agronomía Costarricense* 33(1):91-101.
- Uribe-Lorío, L., Brenes-Guillén, L., WingChing-Jones, R., Uribe, L., García, F., Rodríguez, C., & Aráuz, L. F. (2023). Valorization of Cow Manure: Unraveling Bacterial Community Changes Driven by Vermicomposting and Their Impact on Vermicompost Tea Production. *Waste and Biomass Valorization*, 1-16.
- Uribe-Lorío, L., WingChing-Jones, R., Vidaurre-Barahona, D., Uribe, L., & Aráuz, L. F. (2023). Bacterias cultivables resistentes a oxitetraciclina durante el proceso de vermicompostaje de excretas bovinas. *UNED Research Journal*, 15(1), e4586-e4586.
- Verberg, S., Göker, M., Scheuner, C., Schumann, P., & Stackebrandt, E. (2014). The families Erysipelotrichaceae emend., Coprobacillaceae fam. nov., and Turicibacteraceae fam. nov. The prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes. 4th ed. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 79-105.
- Versteegh, E. A. A., Black, S., & Hodson, M. E. (2017). Carbon isotope fractionation between amorphous calcium carbonate and calcite in earthworm-produced calcium carbonate. *Applied Geochemistry*, 78, 351-356.
- Vijayabharathi, R., Sathya, A., & Gopalakrishnan, S. (2015). Plant growth-promoting microbes from herbal vermicompost. In *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants* (pp. 71-88). Springer, Cham.
- Vindas, M. J. (2019). Espectro de resistencia, estructura genética y relaciones evolutivas de plásmidos conjugativos con resistencia a tetraciclinas aislados de ecosistemas agropecuarios costarricenses. [Tesis Maestría Académica en Microbiología]. Universidad de Costa Rica.
- Virto, M., Santamarina-García, G., Amores, G., & Hernández, I. (2022). Antibiotics in Dairy Production: Where Is the Problem? *Dairy*, 3(3), 541-564.
- Vivas, A., Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., & Benitez, E. (2009). Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial community size and structure, and microbial functional diversity of an olive-mill waste. *Bioresource Technology*, 100(3), 1319-1326.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., ... & Boccard, F. (2006). Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nature biotechnology*, 24(6), 673-679.

- Wang, Y., Yin, Z., Zhao, H., Hu, J., & Kang, Y. (2019). The effects of tetracycline concentrations on tetracycline resistance genes and their bacterial hosts in the gut passages of earthworms (*Eisenia fetida*) feeding on domestic sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(33), 34412-34420.
- Welke, S. E. (2005). The effect of compost extract on the yield of strawberries and the severity of *Botrytis cinerea*. *Journal of Sustainable Agriculture*, 25(1), 57-68.
- Wiegel, J., Tanner, R., & Rainey, F. A. (2006). An introduction to the family Clostridiaceae. The prokaryotes, 4, 654-678.
- Wong, K., Shaw, T. I., Oladeinde, A., Glenn, T. C., Oakley, B., & Molina, M. (2016). Rapid microbiome changes in freshly deposited cow feces under field conditions. *Frontiers in microbiology*, 7, 500.
- Wüst, P. K., Horn, M. A., & Drake, H. L. (2011). Clostridiaceae and Enterobacteriaceae as active fermenters in earthworm gut content. *The ISME journal*, 5(1), 92-106.
- Yasir, M., Aslam, Z., Kim, S. W., Lee, S. W., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2009). Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource technology*, 100(19), 4396-4403.
- Yatoo, A. M., Ali, M., Baba, Z. A., & Hassan, B. (2021). Sustainable management of diseases and pests in crops by vermicompost and vermicompost tea. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 41(1), 1-26.
- Yausheva, E., Sizova, E., Lebedev, S., Skalny, A., Miroshnikov, S., Plotnikov, A., ... & Cherkasov, S. (2016). Influence of zinc nanoparticles on survival of worms *Eisenia fetida* and taxonomic diversity of the gut microflora. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(13), 13245-13254.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol*. 67:1613-1617
- You, X., Kimura, N., Okura, T., Murakami, S., Okano, R., Shimogami, Y., ... & Tojo, M. (2019). Suppressive effects of vermicomposted-bamboo powder on cucumber damping off. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 53:13–19.
- Zalewska, M., Błażejewska, A., Czapko, A., & Popowska, M. (2021). Antibiotics and antibiotic resistance genes in animal manure—consequences of its application in agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 640.

- Zamora K., Castro L., Wang A., Arauz L.F., Uribe L. (2017). Uso potencial de lixiviados y tés de vermicompost en el control del ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. *Agronomía Costarricense* 41(1): 33-51.
- Zhang, B.-G., et al., 2000. Changes in microbial biomass C, N, and P and enzyme activities in soil incubated with the earthworms *Metaphire guillelmi* or *Eisenia fetida*. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2055–2062.
- Zhang, Z., Shen, J., Wang, H., Liu, M., Wu, L., Ping, F., ... & Xu, X. (2014). Attenuation of veterinary antibiotics in full-scale vermicomposting of swine manure via the housefly larvae (*Musca domestica*). *Scientific reports*, 4, 6844.
- Zhang, W., Gong, J., Wu, S., Yin, H., Jin, Y., Wu, H., ... & Wang, R. (2019). Draft genome sequence of phosphate-accumulating bacterium *Acinetobacter tandoii* SC36 from a mangrove wetland ecosystem provides insights into elements of phosphorus removal. *Current microbiology*, 76, 207-212.
- Zhang, H., Li, J., Zhang, Y., & Huang, K. (2020). Quality of vermicompost and microbial community diversity affected by the contrasting temperature during vermicomposting of dewatered sludge. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1748.

CONCLUSIONES

- La resistencia a antibióticos está ampliamente distribuida en bacterias asociadas a plantas (60 %) con un 38 % de los aislamientos resistentes a estreptomicina, 28 % a tetraciclina y 9 % a gentamicina.
- Se encontró prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos presentes en cultivos, tal y como fue detectada en 17 de los 19 cultivos estudiados.
- El repollo, banano y chile dulce fueron los cultivos que presentaron la mayor cantidad y diversidad de fenotipos resistentes a antibióticos.
- Todos los géneros bacterianos identificados por secuenciación del gen ARN 16S ribosomal excepto *Erwinia* presentaron bacterias resistentes algún antibiótico evaluado. De estos, el género *Pseudomonas* fue el más frecuentemente encontrado.
- En este estudio, se identificó una población de bacterias resistentes tanto saprófitas como posibles patógenas de plantas.
- El proceso de vermicompostaje desde las excretas de ganado hasta los subproductos derivados del vermicompost provocaron un cambio en la estructura de la comunidad bacteriana.
- La comunidad bacteriana de las muestras de excretas fue dominada por géneros bacterianos habitantes del rumen y no se observó un cambio en estas en el proceso de precompostaje.
- En el sustrato vermicompost se encontró el mayor número de ASVs entre los cuáles dominaron taxones relacionados con actividad quitinolítica, lignocelulósica, promotora de crecimiento y capacidad para la degradación de materia orgánica compleja del suelo entre otras, que podrían indicar las cualidades asociadas a este tipo de abono.
- El té de vermicompost sin aditivo mantuvo la comunidad central “core” de su material de origen.
- La adición de melaza al té de vermicompost disminuyó la diversidad bacteriana, y causó un aumento de géneros como *Aeromonas* y *Acinetobacter*, conocidos por su capacidad de diseminación de determinantes de resistencia, por lo que se debe estudiar con más profundidad su uso.
- En las diferentes etapas del proceso de vermicompostaje se encontraron bacterias resistentes a antibióticos.
- El precomposteo de las excretas disminuyó el porcentaje de bacterias resistentes, con la presencia de Firmicutes esporulados dominando la población.
- El vermicompost fue el sustrato con el menor número de ASVs resistentes a tetraciclina.

- El té de compost con y sin melaza presentó un incremento en el número de ASVs resistentes a tetraciclina, siendo mayor en el té al que se adicionó melaza

RECOMENDACIONES

- Secuenciar los genomas de las bacterias con RH+ resistentes con el fin de determinar los genes y determinantes de resistencia presentes.
- Evaluar la fitopatogenicidad y rango de hospederos de los aislamientos con RH+.
- Continuar la búsqueda e identificación de bacterias agentes causales de enfermedades en plantas para la determinación de cambios en patrones de resistencia y evaluar métodos de control.
- Se recomienda fomentar el manejo preventivo de enfermedades bacterianas en cultivos como el uso de variedades resistentes, utilización de bacterias promotoras de crecimiento, abonos orgánicos como el vermicompost, rotación de cultivos y control de riego.
- Llevar un registro de los productos a base de antibióticos y antibacterianos utilizados, las dosis y frecuencia de aplicación, además de una observación del éxito o fracaso del tratamiento.
- Se recomienda realizar estudios funcionales del uso del vermicompost y los tés y correlacionarlos con su diversidad y presencia de resistencia a tetraciclinas.
- Estudiar el papel del vermicompost en la disminución de abundancia y diversidad de bacterias resistentes y genes de resistencia.
- No utilizar la melaza de caña como aditivo en la preparación de té de vermicompost
- Se recomienda a los productores de leche realizar algún proceso de compostaje de excretas bovinas antes de utilizarlas como fertilizantes orgánicos.
- Se deben mejorar prácticas de manejo preventivas de infecciones crónicas en las granjas lecheras, como el uso de equipo adecuado de ordeño y la vigilancia de esquemas de vacunación, la nutrición de los animales y seguir las recomendaciones del médico veterinario en el uso de antibióticos, respetando dosis e intervalos.

ANEXO 1 MATERIAL SUPLEMENTARIO

Cuadro S1.1 Identificación de bacterias aisladas de plantas con síntomas de infección y sus características de fitopatogenicidad y resistencia a antibióticos.

Código	Hospedero	Sitio de Muestreo	Susceptibilidad a antibióticos ^b				CMI ^f			Secuencia ARN 16S de cepa tipo más cercana ^g
			RH ^a	E ^c	T ^d	G ^e	E	T	G	
MA-15	Apio	SR. de Oreamuno, Cartago	1	+	-	-	-			<i>Pseudomonas arauntiacae</i> (Biolog)
MA-7	Apio	SR. de Oreamuno, Cartago	2	+	+	-	512*	-		<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T
MA-79	Apio	SR. de Oreamuno, Cartago	2	+	-	-	-			<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T
MA-86	Apio	SR. de Oreamuno	2	i	i	-	128*	24		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T
MA-6	Apio	SR. de Oreamuno, Cartago	0	+	-	-	>1024*			<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-16	Apio	SR. de Oreamuno, Cartago	2	+	-	-	512*			<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-14	Chile dulce	San Isidro, Heredia	1	-	-	-				<i>Acinetobacter lactucae</i> NRRL B-41902 ^T
MA-19	Chile dulce	San Isidro, Heredia	5	+	-	-	>1024	-		<i>Pantoea anthophila</i> LMG 2558 ^T
MA-11	Chile dulce	San Isidro, Heredia	2	+	-	-	-			<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-90	Chile dulce	San Isidro, Heredia	4	-	-	-				<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T
MA-9	Chile dulce	San Isidro, Heredia	2	-	-	-				<i>Pseudomonas maumuensis</i> COW77 ^T
MA-140	Chile dulce	San Isidro, Heredia	5	+	+	+	-	-	12	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-33	Chile dulce	San Isidro, Heredia	4	+	+	-	-	>256		<i>Pseudomonas punonensis</i> CECT 8089 ^T
MA-120	Chile dulce	San Isidro, Heredia	4	-	+	+		>256		<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257 ^T
MA-10	Chile dulce	San Isidro, Heredia	2	+	+	-	16*	>256	-	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-143	Coliflor	Santa Cecilia, Heredia	0	+	-	+	12*	-	32	<i>Acinetobacter lactucae</i> NRRL B-41902 ^T
MA-95	Coliflor	Santa Cecilia, Heredia	5	+	-	-	-			<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-30	Coliflor	Santa Cecilia, Heredia	0	-	-	-				<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-110	Coliflor	Santa Cecilia, Heredia	2	+	-	-	-			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Biolog)
MA-142	Coliflor	Santa Cecilia, Heredia	0	+	-	-	>1024			<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405 ^T
MA-2	Cúrcuma	Chachagua, Guanacaste	4	-	+	-	-	-	12	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> LMG 2683 ^T
MA-38	Cúrcuma	Chachagua, Guanacaste	0	+	-	-	-			<i>Enterobacter huaxiensis</i> 090008 ^T
MA-61	Cúrcuma	Chachagua, Guanacaste	2	+	-	-	>1024*			<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T
MA-8	Cúrcuma	Chachagua, Guanacaste	1	+	-	-	-			<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)
MA-81	Frijol	San Josecito, Heredia	1	-	-	-	-			<i>Pseudomonas azotoformans</i> DSM 18862 ^T
MA-37	Frijol	San Josecito, Heredia	4	+	-	-	24*			<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19304 ^T

Código	Hospedero	Sitio de Muestreo	Susceptibilidad a antibióticos ^b				CMI ^f			Secuencia ARN 16S de cepa tipo más cercana ^g
			RH ^a	E ^c	T ^d	G ^e	E	T	G	
MA-70	Frijol	San Josecito, Heredia	5	-	-	-				<i>Pseudomonas syringae</i> ATCC 19304 ^T
MA-23A	Lechuga Iceberg	Dulce Nombre, Cartago	3	+	-	-	12			<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-224	Lechuga Iceberg	Dulce Nombre, Cartago	4	+	i	i	12			<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBRC 102199 ^T
MA-13A	Lechuga Iceberg	El Guarco, Cartago	4	+	-	-	12			<i>Pectobacterium aroidearum</i> SCRI 109 ^T
MA-13B	Lechuga Iceberg	El Guarco, Cartago	4	+	-	-	96			<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T
MA-14C	Lechuga Iceberg	El Guarco, Cartago	5	+	-	+	-		48	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 19861 ^T
MA-17	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	1	-	-	-				<i>Pseudomonas azotoformans</i> DSM 18862 ^T
MA-82	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	1	+	+	-	-		24	<i>Pseudomonas extremorientalis</i> KMM 3447 ^T
MA-84	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	2	+	-	-	-			<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)
MA-5	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	0	-	-	-				<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)
MA-60	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	1	-	-	-				<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-43A	Lechuga Iceberg	Oreamuno, Cartago	4	+	-	-	12			<i>Raoultella terrigena</i> ATCC 33257 ^T
MA-112	Lechuga Boston	SR. de Oreamuno, Cartago	2	-	+	-	-		128	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-40	Lechuga Boston	SR. de Oreamuno, Cartago	1	-	-	-	32*			<i>Pseudomonas fragi</i> ATCC 4973 ^T
MA-49	Lechuga Boston	SR. de Oreamuno, Cartago	4	-	-	-				<i>Pseudomonas cichorii</i> ATCC 10857 ^T
MA-44	Lechuga Boston	SR. de Oreamuno, Cartago	2	-	+	-	-		>256	<i>Pseudomonas punonensis</i> CECT 8089 ^T
MA-111	Lechuga Boston	SR. de Oreamuno, Cartago	0	-	+	-	-		>256	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-12	Papa	Cot, Cartago	0	+	-	-	-			<i>Psychrobacter aquaticus</i> CMS 56 ^T
MA-32	Repollo	Oreamuno, Cartago	1	-	-	+	-		256	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-36	Repollo	Oreamuno, Cartago	5	-	-	-				<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-18	Repollo	Sta Cecilia, Heredia	3	i	+	+	12		256	<i>Sphingobacterium kitahiroshimense</i> 10C ^T
MA-26	Repollo	Santo Domingo, Heredia	1	-	-	-	-			<i>Pseudomonas moraviensis</i> CCM 7280 ^T
MA-39	Repollo	Santo Domingo, Heredia	1	-	-	-				<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 ^T
MA-106	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	-	+	-	-		>256	<i>Acinetobacter johnsonii</i> CIP 64.6 ^T
MA-98	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	2	-	+	-	-		>256	<i>Carnobacterium inhibens</i> DSM 13024 ^T
MA-104	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	4	-	+	+			256	<i>Escherichia hermannii</i> CIP 103176 ^T
MA-41	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	2	+	-	-	>1024*		-	<i>Pseudomonas capeferrum</i> WCS358 ^T
MA-105	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	+	-	-	24*			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Biolog)

Código	Hospedero	Sitio de Muestreo	Susceptibilidad a antibióticos ^b				CMI ^f			Secuencia ARN 16S de cepa tipo más cercana ^g
			RH ^a	E ^c	T ^d	G ^e	E	T	G	
MA-96	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	2	+	+	-	-	18		<i>Pseudomonas hunanensis</i> LV ^T
MA-48	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	0	+	+	-	-	-		<i>Pseudomonas laurylsulfativorans</i> AP3_22 ^T
MA-85	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	4	+	-	-	-			<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-34	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	+	-	+	48*		24	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-46	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	0	-	-	-	-			<i>Pseudomonas saponiphila</i> DSM 975 ^T
MA-23	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	2	-	-	-	-			<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-91	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	4	-	+	-	-		24	<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT 5989 ^T
MA-22	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	2	-	-	-	-			<i>Psychrobacter pulmonis</i> CECT 5989 ^T
MA-103	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	0	+	-	+	32*		16	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-28	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	0	-	+	-	-	>256		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-29	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	0	-	+	-	-	>256		<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)
MA-35	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	-	+	-	-	>256		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-57	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	-	+	-	-	>256		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-76	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	1	-	-	-	-			<i>Serratia marcescens</i> (Biolog)
MA-107	Repollo	S. Luis, S. Domingo, Heredia	3	-	i	-	-		12	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405 ^T
MA-74	Tomate	Oreamuno, Cartago	3	+	-	-	>1024			<i>Dickeya oryzae</i> ZYY5 ^T
MA-31	Tomate	Oreamuno, Cartago	1	+	-	-	>1024*			<i>Pseudomonas fulva</i> (Biolog)
MA-56	Tomate	Oreamuno, Cartago	2	+	-	-	>1024*			<i>Pseudomonas fulva</i> 12-X ^T
MA-83	Tomate	Oreamuno, Cartago	1	+	-	-	>1024*			<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-113	Tomate	Oreamuno, Cartago	3	+	-	-	-	-	-	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-141	Tomate	Oreamuno, Cartago	2	-	+	-	-	>256	-	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-3	Zanahoria	Zarcelero, Alajuela	1	+	-	-	32*			<i>Pseudomonas azotoformans</i> LMG 21611 ^T
MA-20	Zapallo	SR. de Oreamuno, Cartago	0	+	-	-	48			<i>Klebsiella michiganensis</i> W14 ^T
MA-75	Zapallo	SR. de Oreamuno, Cartago	1	+	-	-	-*			<i>Pseudomonas corrugata</i> (Biolog)
MA-80	Zapallo	SR. de Oreamuno, Cartago	2	+	-	-	16*			<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-50	Palmito	Guápiles, Limón	4	-	-	-	-			<i>Pantoea stewartii</i> subsp indologenes LMG 2632 ^T
MA-65	Palmito	Guápiles, Limón	5	+	-	-	12	12		<i>Pantoea stewartii</i> subsp indologenes LMG 2632 ^T
MA-55	Palmito	Guápiles, Limón	2	+	-	-	12	-		<i>Providencia rettgeri</i> DSM 4542 ^T

Código	Hospedero	Sitio de Muestreo	Susceptibilidad a antibióticos ^b				CMI ^f			Secuencia ARN 16S de cepa tipo más cercana ^g
			RH ^a	E ^c	T ^d	G ^e	E	T	G	
MA-52	Palmito	Guápiles, Limón	5	+	+	-	12	12		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 434 ^T
MA-53	Palmito	Guápiles, Limón	2	-	i	-		12		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 434 ^T
MA-54	Palmito	Guápiles, Limón	5	+	+	+	12	24	256	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 434 ^T
MA-117	Banano	Guápiles, Limón	1	+	-	-	-			<i>Achromobacter spanius</i> LMG 5911 ^T
MA-77	Banano	Guápiles, Limón	2	+	-	+	-		12	<i>Aeromonas caviae</i> (Biolog)
MA-51	Banano	Guápiles, Limón	1	i	i	-	-	12		<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-24	Banano	Guápiles, Limón	1	-	-	-				<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-87	Banano	Guápiles, Limón	0	i	+	-	>1024	>256		<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 ^T
MA-68	Banano	Sixaola, Limón	2	-	-	-				<i>Acinetobacter</i> sp. (Biolog)
MA-101	Banano	Sixaola, Limón	2	-	+	-		12		<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-118	Banano	Sixaola, Limón	4	+	+	-	-	>256	-	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-72	Banano	Sixaola, Limón	1	+	i	-	-	-		<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-97	Banano	Sixaola, Limón	2	+	i	-	-	12		<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-139	Banano	Sixaola, Limón	1	+	i	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-119	Banano	Sixaola, Limón	1	+	+	-	12	-		<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T
MA-59	Higo	San Carlos, Alajuela	0	-	+	-	-	96		<i>Ochrobactrum pseudogrignonensis</i> CCUG 30717 ^T
MA-115	Mango	San Carlos, Alajuela	2	-	-	-				<i>Erwinia billingiae</i> CIP 106121 ^T
MA-124	Mango	San Carlos, Alajuela	2	-	-	-				<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T
MA-127	Mango	San Carlos, Alajuela	1	-	-	-				<i>Pseudomonas putida</i> (Biolog)
MA-125	Mango	San Carlos, Alajuela	0	-	-	-				<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-132	Melón	Guanacaste	3	+	+	-	>1024	12		<i>Achromobacter marplatensis</i> LMG 26685 ^T
MA-128	Melón	Guanacaste	2	-	-	-				<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 ^T
MA-130	Melón	Guanacaste	5	+	+	-	12	12		<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-131	Melón	Guanacaste	1	-	+	-		12		<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0 ^T
MA-129	Melón	Guanacaste	1	-	i	-		-		<i>Pseudomonas</i> sp. (Biolog)
MA-13	Ornamental	Zarcero, Alajuela	1	+	i	-	24*	-	-	<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T
MA-1	Ornamental	Zarcero, Alajuela	0	-	-	-	-			<i>Psychrobacter faecalis</i> Iso-46 ^T
MA-43	Dracaena	Palmares, Alajuela	2	+	i	-	12	-		<i>Comamonas koreensis</i> KCTC 12005 ^T

Código	Hospedero	Sitio de Muestreo	Susceptibilidad a antibióticos ^b				CMI ^f			Secuencia ARN 16S de cepa tipo más cercana ^g
			RH ^a	E ^c	T ^d	G ^e	E	T	G	
MA-89	Dracaena	Palmares, Alajuela	2	-	-	-	-			<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-27	Dracaena	Palmares, Alajuela	1	-	-	-				<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T
MA-136	Dracaena	Palmares, Alajuela	0	-	-	-				<i>Pantoea agglomerans</i> (Biolog)
MA-42	Dracaena	Palmares, Alajuela	2	+	-	-	48*			<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 3738 ^T
MA-88	Dracaena	Palmares, Alajuela	0	+	-	-	-			<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Biolog)
MA-4	Dracaena	Palmares, Alajuela	2	+	-	-	12			<i>Psychrobacter alimentarius</i> JG-100 ^T

a. RH: Reacción Hipersensible. Datos tomados de Herrera (2009)

b. Susceptibilidad a antibióticos según prueba de difusión en disco

c. E: Estreptomicina

d. T: Tetramicina

e. G: Gentamicina

f. Determinación de MIC utilizando e-Test (Solna) en µg/ml

g. En caso de no obtener secuencia se utilizó la identificación por el Sistema automatizado BiologTM

*. Tomado de Méndez (2010)

T. Cepa tipo

Cuadro S2.1. Abundancia relativa de los Filos en las muestras del proceso de vermicompost.

Filo	Abundancia relativa %				
	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
Firmicutes	58	54	7	13.4	0.8
Bacteroidetes	3	35	18	14.5	3
Proteobacteria	6	4	42	39.9	94
Spirochaetes	1	3	0.3	0.2	0.2
Tenericutes	1	1	0.3	0	0
Planctomycetes	0.4	0	2	4.7	0.2
Acidobacteria	0	0	4	3.0	0.2
Chloroflexi	0.8	0	3	5.1	0.2
Verrucomicrobia	0.6	0.7	5	3.3	0.6
Cyanobacteria	0.8	0.6	0.7	0.9	0.2
Nitrospirae	0	0	0.5	0.4	0.6
Chlamydiae	0	0	0.3	0.5	0
Parcubacteria	0	0	0.9	0.4	0
unc. Bacteria	0	0	1.2	0.7	0.3
Saccharibacteria	0.3	0.4	3.2	3.2	0.1
Gemmatimonadetes	0	0	0.8	0.3	0
Dependentiae	0	0	0.3	0.3	0
Elusimicrobia	0.7	0	0.3	0.2	0
Actinobacteria	0.3	0.4	6.2	8.8	0.9
Rhodothermaeota	0	0	0.2	0.2	0
Chlorobi	0	0	0.2	0.2	0
Hydrogenedentes	0	0	0.3	0.1	0
Peregrinibacteria	0	0	0.3	0.1	0
Latescibacteria	0	0	0.4	0.8	0
Kiritimatiellaeota	0.3	0.3	0.9	0	0
Fibrobacteres	0	0.2	1.5	0	0.7
Lentisphaerae	0.2	1.0	0.5	0	0
Nanoarchaeaeota	0	0	0.4	0	0
Omnitrophicaeota	0	0	0.3	0	0
Fusobacteria	0	0.8	0	0	0
Entotheonellaeota	0	0	0.3	0.3	0
Armatimonadetes	0	0	0.2	0.3	0
unc. Archaea	0	0	0.1	0.2	0
Deinococcus-Thermus	0	0	0.2	0	0
Euryarchaeota	0	0.2	0.2	0.5	0
Margulisbacteria	0	0	0.9	0	0
Microgenomates	0	0	0.2	0.4	0.5

Excretas de ganado frescas (CM), precompostadas (CMC), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

Cuadro S2.2. Abundancia relativa de los ASVs identificados por análisis filogenético como especies con potencial patogénico clínico o animal en las muestras del proceso de vermicompost.

ASV ID	Clase	Especie	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
ASV-132	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium givum</i>	0	0	0	0.1	0
ASV-134	Actinobacteria	<i>Mycobacterium sp.</i>	0	0	0.1	0	0
ASV-135	Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium holsaticum</i>	0	0	0	0	0
ASV-841	Bacilli	<i>Streptococcus sp.</i>	0.2	0	0	0	0
ASV-842	Bacilli	<i>Streptococcus sp.</i>	0.1	0	0	0	0
ASV-936	Clostridia	<i>Clostridium subterminale</i>	0	0	0	0.1	0
ASV-937	Clostridia	<i>Clostridium subterminale</i>	0.1	0.3	0	0	0
ASV-918	Clostridia	<i>Clostridium butyricum</i>	0.2	0.2	0.3	0.4	0
ASV-919	Clostridia	<i>Clostridium butyricum</i>	0.1	0	0	0.2	0
ASV-920	Clostridia	<i>Clostridium butyricum</i>	0.2	0	0	0	0
ASV-923	Clostridia	<i>Clostridium neonatale</i>	0.5	0	0	0.2	0
ASV-924	Clostridia	<i>Clostridium neonatale</i>	0.3	0	0	0.1	0
ASV-925	Clostridia	<i>Clostridium neonatale</i>	0.0	0.1	0.1	0	0
ASV-930	Clostridia	<i>Clostridium septicum</i>	0.3	0.1	0	0	0
ASV-938	Clostridia	<i>Clostridium botulinum</i>	0	0	0.01	0	0
ASV-939	Clostridia	<i>Clostridium cadaveris</i>	0.1	0	0	0	0
ASV-791	Epsilonproteobacteria	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	0	0.1	0	0	0
ASV-2056	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas caviae</i>	0	0	0	0	2
ASV-2057	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0.1	0.1	7
ASV-2058	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	1
ASV-2059	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	3
ASV-2060	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	2
ASV-2677	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	2.
ASV-2063	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas media</i>	0	0	0	0.3	22
ASV-2064	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas media</i>	0	0	0	0	4
ASV-2065	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas media</i>	0	0	0	0	0.9
ASV-2071	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	0.3	9
ASV-2675	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	0	4
ASV-2674	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	0	2
ASV-2678	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	0	1.6
ASV-2676	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	0	0.6
ASV-2072	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas rivuli</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2070	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas popoffii</i>	0	0	0	0	2.0
ASV-2074	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas intestinalis</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2075	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas salmonicida</i>	0	0	0	0	0.2
ASV-2136	Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter werkmanii</i>	0	0	0	0	0.2
ASV-2137	Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter youngae</i>	0	0	0	0	0.4
ASV-2142	Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0.2
ASV-2144	Gammaproteobacteria	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2138	Gammaproteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	0	0	0	0.3

ASV ID	Clase	Especie	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
ASV-2139	Gammaproteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2140	Gammaproteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	0	0	0	0.1
ASV-2145	Gammaproteobacteria	<i>Cronobacter sakazakii</i>	0	0	0	0	0.4
ASV-2141	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0.2
ASV-2143	Gammaproteobacteria	<i>Escherichia-Shigella</i>	0.1	0	0	0	0
ASV-2146	Gammaproteobacteria	<i>Proteus hauseri</i>	0	0	0	0.01	0
ASV-2135	Gammaproteobacteria	<i>Scandinavium goeteborgense</i>	0	0	0	0	0.2
ASV-2172	Gammaproteobacteria	<i>Legionella feeleii</i>	0	0	0.1	0	0
ASV-2174	Gammaproteobacteria	<i>Legionella oakridgensis</i>	0	0	0	0	0
ASV-2202	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	0	0	1.0	7.7
ASV-2206	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	0	0	0.3	2.3
ASV-2204	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	0.3	0	0	0	0.3
ASV-2205	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2208	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter vivianii</i>	0	0	0	0	0.5
ASV-2209	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	0	0	0.4
ASV-2207	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter colistiniresistens</i>	0.5	0.1	0	0	0
ASV-2213	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter colistiniresistens</i>	0	0	0	0	0.1
ASV-2201	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter indicus</i>	0	0	0	0	0.3
ASV-2198	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter indicus</i>	0.3	0	0	0	0.2
ASV-2199	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter indicus</i>	0.3	0	0	0	0.1
ASV-2517	Spirochaetia	<i>Treponema sp.</i>	0	0.8	0	0	0
ASV-2516	Spirochaetia	<i>Treponema sp.</i>	0.2	0.6	0	0	0
ASV-2520	Spirochaetia	<i>Treponema sp.</i>	0.1	0.1	0	0	0
ASV-2521	Spirochaetia	<i>Treponema sp.</i>	0	0.2	0	0	0
ASV-2545	Mollicutes	<i>Anaeroplasma sp.</i>	0	0	0	0	0
ASV-2533	Mollicutes	<i>Acholeplasma hippikon</i>	0	0.1	0	0	0
Total			4	2.8	1	3	78

Excretas de ganado frescas (CM), precompostadas (CMC), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

Cuadro S2.3 Datos de similitud y disimilitud entre las muestras del proceso de vermicompostaje determinados por el análisis de Porcentaje de Similitud (SIMPER).

	Análisis Simper	Filo	Género
Similitud	Dentro de grupo a (CM y CMC)	92	71
	Dentro de grupo b (VC y VCT)	89	75
Disimilitud promedio	Entre Grupo a/ Grupo b	54	87
	Entre Grupo a/c (VCTM)	63	93
	Entre Grupo /c (VCTM)	49	77

Excretas de ganado frescas (CM), precompostadas (CMC), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

Cuadro S2.4 Abundancia relativa de las Clases en las muestras del proceso de vermicompostaje

Clase	Filo	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
Vicinamibacteria	Acidobacteria	0.0	0.0	2.7	1.3	0.2
Acidobacteriia	Acidobacteria	0.0	0.0	0.8	0.8	0.1
Thermoanaerobaculia	Acidobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Blastocatellia	Acidobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Holophagae	Acidobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acidimicrobiia	Actinobacteria	0.0	0.0	3.4	4.8	0.3
Actinobacteria	Actinobacteria	0.1	0.0	1.1	1.3	0.2
Actinomycetia	Actinobacteria	0.2	0.3	0.9	1.8	0.4
Rubrobacteria	Actinobacteria	0.0	0.0	0.4	0.3	0.0
Thermoleophilia	Actinobacteria	0.0	0.0	0.3	0.6	0.0
unc. Actinobacteria	Actinobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nitriliruptoria	Actinobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Coriobacteriia	Actinobacteria	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
Fimbriimonadia	Armatimonadetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cytophagia	Bacteroidetes	0.0	0.0	6.1	4.2	0.5
Flavobacteriia	Bacteroidetes	0.3	0.7	6.0	5.0	2.1
Chitinophagia	Bacteroidetes	0.0	0.0	4.9	3.5	0.2
Sphingobacteriia	Bacteroidetes	0.0	0.1	1.2	1.3	0.2
Bacteroidia	Bacteroidetes	30.1	34	0.2	0.1	0.0
Ignavibacteria	Bacteroidetes	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
Chlamydiae	Chlamydiae	0.0	0.0	0.3	0.5	0.0
unc. Chlorobi	Chlorobi	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
Anaerolineae	Chloroflexi	0.0	0.0	0.9	2.2	0.1
unc. Chloroflexi	Chloroflexi	0.0	0.0	0.8	0.9	0.1
Thermomicrobia	Chloroflexi	0.0	0.0	0.6	1.7	0.0
Tepidiformia	Chloroflexi	0.0	0.0	0.3	0.3	0.0
Dehalococcoidia	Chloroflexi	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0
unc. Cyanobacteria	Cyanobacteria	0.0	0.0	0.5	0.7	0.0
Vampirovibrio	Cyanobacteria	0.8	0.6	0.2	0.1	0.0
Deinococci	Deinococcus-Thermus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Babeliae	Dependentiae	0.0	0.0	0.2	0.3	0.0
unc. Elusimicrobia	Elusimicrobia	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0
Elusimicrobia	Elusimicrobia	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Entotheonellia	Entotheonellaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Methanomicrobia	Euryarchaeota	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
Methanobacteria	Euryarchaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fibrobacteria	Fibrobacteres	0.0	0.3	1.5	0.5	0.1
Chitinispirillia	Fibrobacteres	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0
Clostridia	Firmicutes	53.7	48	5.5	10.5	0.4
Bacilli	Firmicutes	2.1	0.1	1.3	1.8	0.4
Erysipelotrichia	Firmicutes	1.1	3.7	0.5	1.0	0.1
Limnochordia	Firmicutes	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

Clase	Filo	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
Tissierellia	Firmicutes	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0
Negativicutes	Firmicutes	1.5	2.3	0.0	0.0	0.0
unc. Firmicutes	Firmicutes	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Fusobacteriia	Fusobacteria	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Longimicrobia	Gemmatimonadetes	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0
Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
unc. Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Hydrogenedentia	Hydrogenedentes	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0
Kiritimatiellae	Kiritimatiellaeota	0.3	0.3	0.0	0.0	0.0
Latescibacter	Latescibacteria	0.0	0.0	0.4	0.1	0.0
unc. Lentisphaerae	Lentisphaerae	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
Lentisphaeria	Lentisphaerae	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0
unc. Margulisbacteria	Margulisbacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Microgenomatus	Microgenomates	0.0	0.0	0.3	0.4	0.0
Woearchaeia	Nanoarchaeaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
unc. Nanoarchaeaeota	Nanoarchaeaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nitrospira	Nitrospirae	0.0	0.0	0.5	0.4	0.1
unc. Omnitrophicaeota	Omnitrophicaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Omnitrophia	Omnitrophicaeota	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
unc. Parcubacteria	Parcubacteria	0.0	0.0	0.9	0.4	0.0
Peribacteria	Peregrinibacteria	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Planctomycetia	Planctomycetes	0.0	0.0	0.9	4.2	0.3
Phycisphaerae	Planctomycetes	0.0	0.0	0.8	0.2	0.0
unc. Planctomycetes	Planctomycetes	0.0	0.0	0.6	0.1	0.0
OM190	Planctomycetes	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Gammaproteobacteria	Proteobacteria	5.1	2.1	16.7	20.8	92.2
Alphaproteobacteria	Proteobacteria	0.5	0.7	8.3	8.9	0.8
Deltaproteobacteria	Proteobacteria	0.7	0.9	6.8	3.3	0.2
<u>Betaproteobacteria</u>	<u>Proteobacteria</u>	<u>0.2</u>	<u>0.4</u>	<u>6.1</u>	<u>4.6</u>	<u>0.6</u>
Oligoflexia	Proteobacteria	0.0	0.0	4.2	2.1	0.1
unc. Proteobacteria	Proteobacteria	0.0	0.0	0.2	0.1	0.0
Hydrogenophilalia	Proteobacteria	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
Polyangia	Proteobacteria	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
Epsilonproteobacteria	Proteobacteria	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
Bradymonadales	Proteobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Balneolia	Rhodothermaeota	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
Saccharimonas	Saccharibacteria	0.3	0.4	3.2	3.0	0.1
Spirochaetia	Spirochaetes	1.1	2.6	0.3	0.2	0.0
Leptospirae	Spirochaetes	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mollicutes	Tenericutes	1.1	1.2	0.0	0.0	0.0
unc. Archaea	unc. Archaea	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
unc. Bacteria	unc. Bacteria	0.0	0.0	1.2	0.7	0.0
Opitutae	Verrucomicrobia	0.0	0.1	2.7	1.6	0.3

Clase	Filo	CM	CMC	VC	VCT	VCTM
Verrucomicrobiae	Verrucomicrobia	0.5	0.6	2.5	1.3	0.2
Spartobacteria	Verrucomicrobia	0.0	0.0	0.1	0.4	0.1
Methylacidiphilae	Verrucomicrobia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Excretas de ganado frescas (CM), precompostadas (CMC), vermicompost (VC) y tes de vermicompost sin (VCT) y con melaza (VCTM).

Cuadro S2.5 Identificación de ASVs crecidos en caldos suplementados con 10 µg/ml de oxitetraciclina a partir de muestras del proceso de vermicompostaje.

ASV	Phylum	Especie	CM-TB	CMC-TB	VC-TB	VCT-TB	VCTM-TB
ASV-103	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	41	0	0	0	0
ASV-179	Bacteroidetes	<i>Bacteroides graminisolvans</i>	42	0	0	0	0
ASV-182	Bacteroidetes	<i>unc. Bacteroidaceae</i>	68	0	0	0	0
ASV-194	Bacteroidetes	<i>unc. Bacteroidaceae</i>	35	0	0	0	0
ASV-217	Bacteroidetes	<i>unc. Bacteroidaceae</i>	44	0	0	0	0
ASV-258	Bacteroidetes	<i>unc. Muribaculaceae</i>	14	0	0	0	0
ASV-303	Bacteroidetes	<i>Alloprevotella sp.</i>	20	0	0	0	0
ASV-311	Bacteroidetes	<i>Prevotella paludivivens</i>	0	33	0	0	0
ASV-314	Bacteroidetes	<i>Prevotella sp.</i>	0	11	0	0	0
ASV-383	Bacteroidetes	<i>unc. Bacteroidales</i>	95	0	0	0	0
ASV-412	Bacteroidetes	<i>unc. Bacteroidales</i>	12	0	0	0	0
ASV-2673	Bacteroidetes	<i>Faecalibacter macacae</i>	37	0	0	0	0
ASV-2672	Bacteroidetes	<i>Myroides marinus</i>	0	0	27629	0	0
ASV-592	Bacteroidetes	<i>Myroides marinus</i>	0	0	7929	0	0
ASV-593	Bacteroidetes	<i>Myroides odoratus</i>	0	0	299	109	0
ASV-566	Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium rhizoplanae</i>	0	0	70	19	189
ASV-493	Bacteroidetes	<i>unc. Saprospiraceae</i>	0	0	0	6	0
ASV-816	Firmicutes	<i>Bacillus sp.</i>	0	2900	0	692	0
ASV-830	Firmicutes	<i>Kurthia massiliensis</i>	4796	0	0	0	0
ASV-831	Firmicutes	<i>Kurthia sp.</i>	121	0	0	75	0
ASV-834	Firmicutes	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	0	122	0	0	0
ASV-835	Firmicutes	<i>Solibacillus silvestris</i>	0	1552	0	114	0
ASV-841	Firmicutes	<i>Streptococcus sp.</i>	201	0	0	0	0
ASV-842	Firmicutes	<i>Streptococcus sp.</i>	25	0	0	0	0
ASV-918	Firmicutes	<i>Clostridium butyricum</i>	16	46	0	58	0
ASV-933	Firmicutes	<i>Clostridium senegalense</i>	0	0	0	73	0
ASV-936	Firmicutes	<i>Clostridium subterminale</i>	0	0	0	630	0
ASV-923	Firmicutes	<i>Clostridium neonatale</i>	32	0	0	0	0
ASV-1109	Firmicutes	<i>Paeniclostridium sordellii</i>	52	0	0	0	0
ASV-1423	Firmicutes	<i>Turicibacter sanguinis</i>	22	0	0	0	0
ASV-1457	Firmicutes	<i>Phascolarctobacterium sp.</i>	37	0	0	0	0
ASV-1930	Proteobacteria	<i>Comamonas thiooxydans</i>	0	0	9514	0	0
ASV-2056	Proteobacteria	<i>Aeromonas caviae</i>	2336	0	0	1337	13582
ASV-2057	Proteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	1064	616
ASV-2677	Proteobacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	135	0	0	0	0
ASV-2071	Proteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	1665	1005
ASV-2675	Proteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	680	391
ASV-2674	Proteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	429	275
ASV-2678	Proteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	345	187
ASV-2676	Proteobacteria	<i>Aeromonas rivipollensis</i>	0	0	0	105	69

ASV	Phylum	Especie	CM-TB	CMC-TB	VC-TB	VCT-TB	VCTM-TB
ASV-2073	Proteobacteria	<i>Aeromonas sanarellii</i>	2406	0	0	5505	7513
ASV-2084	Proteobacteria	<i>Succinivibrio sp.</i>	31	0	0	0	0
ASV-2088	Proteobacteria	<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	166	0
ASV-2137	Proteobacteria	<i>Citrobacter youngae</i>	37	0	0	0	0
ASV-2143	Proteobacteria	<i>Escherichia-Shigella</i>	2122	207	0	99	51
ASV-2146	Proteobacteria	<i>Proteus hauseri</i>	122	0	0	254	167
ASV-2209	Proteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	74	0	0	75
ASV-2213	Proteobacteria	<i>Acinetobacter colistiniresistens</i>	1092	0	0	878	223
ASV-2212	Proteobacteria	<i>Acinetobacter gandensis</i>	50	0	0	0	75
ASV-2199	Proteobacteria	<i>Acinetobacter indicus</i>	38	0	0	0	0
ASV-2202	Proteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	0	0	0	229
ASV-2680	Proteobacteria	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	70	0	0	0	0
ASV-2204	Proteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	155	0	0	0	32
ASV-2205	Proteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	52	0	0	0	0
ASV-2200	Proteobacteria	<i>Acinetobacter variabilis</i>	0	1064	0	219	81
ASV-2218	Proteobacteria	<i>Pseudomonas entomophila</i>	0	0	0	145	0
		<i>Pseudomonas</i>					
ASV-2228	Proteobacteria	<i>hunanensis/alloputida</i>	0	0	0	0	39
ASV-2516	Spirochaetes	<i>Treponema sp.</i>	0	20	0	0	0

Excretas de ganado frescas (CM-TB), precompostadas (CMC-TB), vermicompost (VC-TB) y tes de vermicompost sin (VCT-TB) y con melaza (VCTM-TB).