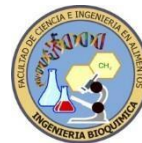




**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN**  
**ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Tema: Evaluación de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en muestras de aguas superficiales, sedimentos de río y canales de agua de riego en cinco provincias del Ecuador**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

El estudio es parte del proyecto: **“EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE DETERMINANTES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EMERGENTES EN MUESTRAS DE AGUAS DE RIEGO Y SUPERFICIALES DEL ECUADOR”** aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por La Dirección de investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución, 0192-CU-P-2018.

**AUTOR:** Guijarro Portero Violeta Jeannette  
**TUTOR:** Quim Calero Cáceres, William Ricardo PhD.

**Ambato – Ecuador**

**Diciembre - 2019**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

**CERTIFICA**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 5 de Noviembre de 2019



-----  
PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Guijarro Portero Violeta Jeannette, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Violeta Guijarro', is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat illegible due to the cursive nature of the writing.

-----  
Guijarro Portero Violeta Jeannette

C.I. 180459288-7

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

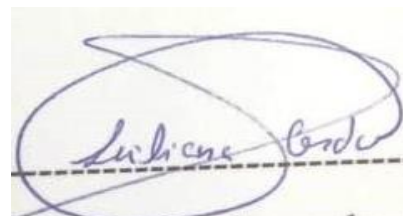


Presidente del Tribunal



Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1



Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 18041488086

Ambato, 06 de Diciembre de 2019

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



-----  
Gujarro Portero Violeta Jeannette

C.I. 180459288-7

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanos por ser una guía en mí caminar  
y brindarme su amor, apoyo, y sacrificio incondicional,  
quienes han permitido que un sueño  
más en mi vida se cumpla.

**Violeta Guijarro**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a Dios por bendecir mi vida y la de mi familia, por brindarme la fuerza necesaria para no desfallecer en aquellos momentos de dificultad durante mi caminar en la vida y por permitir que mis sueños se cumplan.

A mis padres Armando Guijarro y Nelly Portero, por el sacrificio que hicieron para que nunca me faltase nada, por inculcarme valores y enseñarme el verdadero e importante concepto de la responsabilidad “Medida justa para todas las cosas” y sobre las etapas de la vida, etapas que no solo se componen del nacer, crecer, reproducirse y morir, sino también del “Formarse profesionalmente”, gracias a ellos por enseñarme con el ejemplo a nunca rendirme, por ser el motor de mis sueños, quienes con su infinito amor, sacrificio y palabras de aliento, han hecho posible la elaboración de este proyecto.

A mis hermanos Max y Marilyn, por ser mis mejores amigos de sangre, quienes han hecho más fácil la vida de su pequeña, para que nunca me falte nada y así pueda cumplir mis sueños, gracias a ellos por brindarme su amor, consejos sinceros y enseñarme con el ejemplo que los sueños se pueden cumplir cuando actuamos por lo que queremos, siempre confiando en Dios y teniendo fe en nosotros mismos. Gracias por creer en mí siempre.

Finalmente le agradezco a mi tutor Dr. William Calero, quien más que mi tutor fue mi amigo, gracias por confiar en mí, por incrementar mis conocimientos en biología molecular y reprimirme para ser una buena profesional, gracias por sus consejos, por su apoyo incondicional y gran paciencia durante la ejecución de este proyecto, pues sin sus conocimientos y ayuda no habría sido posible la elaboración del mismo.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos .....	1
1.2. Objetivos .....	6
1.2.1. Objetivo general .....	6
1.2.2. Objetivos específicos .....	6
CAPITULO II .....	8
METODOLOGÍA .....	8
2.1. Materiales y equipos .....	8
2.2. Métodos.....	10
2.2.1. Puntos de muestreo y toma de muestras.....	10
2.2.2. Extracción de DNA bacteriano .....	12
❖ Protocolo de extracción de DNA bacteriano para muestras líquidas (agua). Modificaciones realizadas al método QIAamp DNA blood Mini kit, Quiagen Inc., USA) .....	12
❖ Protocolo de extracción de DNA Bacteriano para muestras sólidas (sedimentos) (Powersoil DNA Isolation Kit, MoBio Lab, Inc, USA) .....	14
2.2.3. Amplificación de genes de resistencia mediante la técnica de PCR convencional	15
❖ Preparación de soluciones de TBE 1 X y agarosa.....	17



❖ Electroforesis en gel de agarosa .....	18
2.2.4. Amplificación y cuantificación de genes de resistencia mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) .....	18
❖ Reacción de PCR cuantitativa (qPCR) mediante la técnica TaqMan para los genes <i>sulI</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>tet(W)</i> , <i>qnrS</i> y 16S rDNA .....	18
❖ Amplificación y cuantificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica SYBR-Green para el gen <i>ermB</i> .....	20
❖ Condiciones de reacción para la técnica PCR cuantitativa (qPCR).....	20
CAPITULO III.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
3.1. Análisis y discusión de los resultados.....	23
3.1.1. Análisis de los resultados .....	23
❖ Detección y cuantificación de cinco genes de resistencia a antibióticos ( <i>sulI</i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>qnrS</i> , <i>ermB</i> y <i>tetW</i> , por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y de los genes <i>int1</i> y 16S rDNA en aguas y sedimentos de cinco provincias del Ecuador. (Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua).....	23
❖ Detección de la presencia de 9 genes de resistencia a antibióticos ( <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>CMY</sub></i> , <i>mcr-1</i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> y <i>bla<sub>KPC</sub></i> ) por medio de PCR convencional (PCR).....	34
3.1.2. Discusión de los resultados .....	40
❖ Cuantificación de ARGs mediante qPCR en muestras de agua y sedimentos de ríos y canales de agua de riego .....	40
❖ Abundancia relativa (ARGs/16S normalizado) por punto de muestreo	44
❖ Detección de la presencia de ARGs ( <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>CMY</sub></i> , <i>mcr-1</i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> y <i>bla<sub>KPC</sub></i> ) por medio de PCR convencional (PCR) en muestras de aguas y sedimentos de canales de agua de riego y ríos.....	52
CAPITULO IV.....	55
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
4.1. Conclusiones .....	55
4.2. Recomendaciones.....	56
BIBLIOGRAFÍA .....	57
ANEXOS .....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Puntos de muestreo Coordenadas geográficas de muestras de aguas y sedimentos de cinco provincias del Ecuador. (Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua) .....	11
Tabla 2. Matriz y cantidades de muestra según el método de extracción y densidad de macromoléculas presentes.....	12
Tabla 3. Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia	15
Tabla 4. Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR convencional.....	16
Tabla 5. Protocolo de PCR convencional para la amplificación de genes de resistencia.....	17
Tabla 6. Protocolo de qPCR con sondas TaqMan.....	19
Tabla 7. Protocolo de qPCR SYBR Green.....	20
Tabla 8. Condiciones de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR).....	21
Tabla 9. Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR).....	22
Tabla 10. Presencia de ARGs en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos mediante la técnica de PCR convencional.....	36
Tabla 11. Presencia de ARGs en muestras de sedimentos de canales de riego y de ríos mediante la técnica de PCR convencional .....	38
Tabla 12. Cuantificación de ARGs ( $\text{Log}_{10}$ GC/mL) en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos .....	71
Tabla 13. Cuantificación de ARGs ( $\text{Log}_{10}$ GC/g) en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos .....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Box Plot con valores promediados $\log_{10}GC/mL$ obtenidos de todos los ARG en el DNA presente en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos (C: Canales de riego; R: Ríos) .....	24
Figura 2. Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC /g$ ) obtenidos de todos los ARG en el DNA presente en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos (C: Canales de riego; R: Ríos).....	26
Figura 3. Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC/mL$ ) obtenidos de todos los ARGs en el DNA presente en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos por provincias (M: Manabí, G: Guayas, P: Pichincha, C: Cotopaxi, T: Tungurahua). .....	28
Figura 4. Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC/g$ ) obtenidos de todos los ARGs en el DNA presente en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos de cinco provincias del Ecuador (M: Manabí, G: Guayas, P: Pichincha, C: Cotopaxi, T: Tungurahua). .....	28
Figura 5. Diagrama de barras que representa las abundancias relativas de ARGs en muestras de aguas de canales de riego (valor normalizado 16S rDNA .....	31
Figura 6. Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de aguas de ríos. (valor normalizado16S rDNA).....	32
Figura 7. Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de sedimentos de canales de riego (valor normalizado 16S rDNA) .....	33
Figura 8. Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de sedimentos de ríos (Valor normalizado16S rDNA) .....	34
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa.....	74
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa.....	74
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa.....	74
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa.....	75
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa.....	75
Figura 14. Puntos de muestreo de las provincias: Manabí, Guayas, Cotopaxi , Pichincha y Tungurahua.....	77
Figura 15. Puntos de muestreo de la provincia de Manabí .....	77
Figura 16. Puntos de muestreo de la provincia del Guayas .....	78

Figura 17. Puntos de muestreo de las provincias: Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua. .....	78
Figura 18. Puntos de muestreo de la provincia de Pichincha.....	79
Figura 19. Puntos de muestreo de la provincia de Cotopaxi.....	79
Figura 20. Puntos de muestreo de la provincia de Tungurahua .....	80

## RESUMEN

En Ecuador, se estima que el 88% de las aguas residuales son descargadas en los ríos, los cuales presentan contaminación con microorganismos patógenos y sustancias químicas tóxicas, lo cual es notable en los ríos de las ciudades de Quito, Guayaquil, Cuenca, Riobamba, Ambato, Latacunga y Esmeraldas; aguas que alimentan a canales y acequias de riego. Estos puntos podrían representar un potencial reactor de genotipos de resistencia que podrían propagarse fácilmente a través de los alimentos hacia bacterias de la microbiota humana. En el presente proyecto de investigación se evaluó la diseminación de genes de resistencia a antibióticos en muestras de aguas, sedimentos de ríos y canales de riego en cinco provincias del Ecuador. En mayor frecuencia se detectaron y cuantificaron los genes de resistencia a sulfonamidas *sulI* y al betalactámico *bla<sub>TEM</sub>* en aguas y sedimentos mediante la técnica de qPCR, genes con resistencia a carbapenémicos (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*) y a betalactámicos (*bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>*) fueron detectados en mayor frecuencia en el canal derivado del punto de captación Naranjito-Guayas, mediante la técnica de PCR (convencional). Los puntos mayormente afectados con ARGs en la provincia de Tungurahua fueron: el canal de agua Ambato-Huachi-Pelileo y el sedimento del río Ambato; en la provincia de Pichincha, el agua del río Pita y el agua y sedimento del río Machángara y en la provincia de Manabí, en el sedimento del canal Portoviejo. Se establece por tanto que los ríos y canales de riego evaluados de Ecuador, presentan un nivel antropogénico alto, los cuales podrían actuar como reservorios y contribuir a la diseminación de ARGs en el medio ambiente.

**Palabras claves:** Contaminación antropogénica, aguas, sedimentos, patógenos, genes de resistencia, diseminación.

## ABSTRACT

In Ecuador, it is estimated that 88% of wastewater is discharged into rivers, which present contamination with pathogenic microorganisms and toxic chemicals, which is notable in the rivers of the cities of Quito, Guayaquil, Cuenca, Riobamba, Ambato, Latacunga and Esmeraldas; waters that feed irrigation canals and ditches. These points could represent a potential reactor of resistance genotypes that could easily spread through food to bacteria in the human microbiota. In the present research project the dissemination of antibiotic resistance genes in water samples, river sediments and irrigation canals in five provinces of Ecuador was evaluated. In a higher frequency, the sulphonamide *sulI* and beta-lactam *bla*<sub>TEM</sub> resistance genes in waters and sediments were detected and quantified using the qPCR technique, genes with resistance to carbapenems (*bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>) and beta-lactams (*bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>) were detected in the channel derived from the Naranjito-Guayas collection point using the PCR technique (conventional). The points mostly affected with ARGs in the province of Tungurahua were: the Ambato-Huachi-Pelileo water channel and the Ambato river sediment; in the province of Pichincha, the water of the Pita river and water and sediment of the Machángara river; in the province of Manabí, in the sediment of the Portoviejo canal. It is therefore established that the rivers and irrigation canals evaluated in Ecuador have a high anthropogenic level, which could act as reservoirs and contribute to the dissemination of ARGs in the environment.

**Keywords:** Anthropogenic contamination, water, sediments, pathogens, resistance genes, dissemination.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

El incremento del uso de antibióticos en los últimos 100 años, catalizado con el escaso control en la prescripción y uso de los mismos a nivel mundial, ha originado un incremento en los perfiles de resistencia de diferentes bacterias, que como consecuencia han generado uno de los mayores problemas de salud pública del siglo 21 (**World Health Organization, 2015**). La presencia de estos compuestos en muchos ambientes, ha provocado una modificación de la estructura del microbioma, por consiguiente se han generado nuevos clones y se han elevado las densidades de las poblaciones bacterianas resistentes (**Gullberg et al., 2011; Gullberg et al., 2014**)

La investigación enfocada a los mecanismos de resistencia se ha centrado mayoritariamente en bacterias patógenas de origen clínico, sin embargo, estos estudios proveen información limitada sobre los orígenes y fuentes de la resistencia a antibióticos (**Wright, 2007**). Una visión general de los mecanismos de resistencia debería incluir diferentes ambientes, con la finalidad de visualizar de manera global los elementos ecológicos y genéticos que regulan la evolución y la transmisión de las resistencias a antibióticos. Esta visión global es la que se propone desde la perspectiva “One Health”, en la que se sugiere realizar investigaciones multidisciplinarias en diferentes escalas a nivel local, nacional y global (**Queenan et al., 2016; Robinson et al., 2016**).

En los últimos años se ha destacado el papel del medio ambiente en el origen y la evolución de determinantes de resistencia a antibióticos (**Berglund, 2015**). El uso de antibióticos en diversos ambientes como: hospitales, industrias farmacéuticas, granjas, acuicultura, agricultura, y en la población en general,

favorece la selección de organismos resistentes y promueve la transmisión de genes de resistencia (**Berendonk et al., 2015; Lupo, Coyne, & Berendonk, 2012**). Los ambientes acuáticos como: ríos, descargas de aguas residuales, lagos, etc., han recibido una especial atención, ya que pueden facilitar el transporte y por consiguiente la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos (**Aminov & Mackie, 2007; Calero-Cáceres et al., 2017; Colomer-Lluch et al., 2014; Czekalski et al., 2014; Piedra-Carrasco 2017**).

El sector agrícola es el mayor consumidor de antibióticos al rededor del mundo, con porcentajes superiores al 50% del volumen total de antibióticos de importancia clínica (**O'Neill, 2015**). Los antibióticos más comúnmente utilizados en el sector agrícola y veterinario son las penicilinas (amoxicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (doxiciclina, oxitetraciclina), macrólidos (eritromicina, tilosina), aminoglucósidos, sulfonamida/trimetoprima, polimixinas (colistina) y antimicrobianos (tiamulina) (**Economou & Gousia, 2015**). El uso de agentes antimicrobianos veterinarios en animales de granja y en la agricultura representa un problema potencial de salud pública y ambiental, por lo cual se ha hecho un llamado a limitar su uso, con el fin de reducir la evolución y dispersión de nuevos ARBs (bacterias resistentes a antibióticos) y ARGs (genes de resistencia a antibióticos) en diferentes ecosistemas (**Woolhouse, Ward, van Bunnik, & Farrar, 2015**).

En Ecuador, se estima que el 88% de las aguas residuales son descargadas en los ríos (**Diario la Hora, 2016**). La Secretaría Nacional del Agua, estima que el 70% del agua de cuencas hidrográficas por debajo de 2.800 msnm, no es apta para el consumo humano directo, debido a la contaminación con microorganismos patógenos y a la presencia de sustancias químicas tóxicas (**Sánchez, 2014**). En el sector rural, la falta de planeación del sector público ha derivado en que los canales y acequias de riego sean los destinos principales de las descargas de aguas residuales (**Gobierno Provincial de Tungurahua, 2014**). La mayor parte de los ríos del país presentan una deficiente calidad microbiológica y química, la cual es notable en los ríos de las



ciudades de Quito, Guayaquil, Cuenca, Riobamba, Ambato, Latacunga y Esmeraldas **(Subsecretaría de Riego y Drenaje, 2011)**.

Para la evaluación de la calidad del agua, se utilizan diferentes métodos y tecnologías fisicoquímicas y biológicas para la detección y cuantificación de analitos indicadores, sin embargo, las nuevas generaciones de tecnologías analíticas nos permiten tener una visión ampliada con respecto a la presencia y niveles de compuestos químicos y biológicos que no han sido estudiados anteriormente y que pueden representar un peligro potencial **(Boxall, 2012)**. Los ARBs y ARGs son considerados como contaminantes emergentes del agua, los cuales presentan una elevada diseminación y cuyos niveles pueden ser vinculados a contaminación antropogénica **(Cytryn, 2013; Karkman, Do, Walsh, & Virta, 2018; Zhang, Zhang, & Fang, 2009)**, motivo por el cual, su detección y cuantificación representa un indicador de la calidad de agua y de eficiencia de procesos de desinfección **(Fahrenfeld, Ma, O'Brien, & Pruden, 2013)**.

En la actualidad las técnicas de PCR convencional y qPCR en sus variantes TaqMan y Sybr Green, han sido más ampliamente utilizadas en este tipo de estudios con matrices ambientales para determinar la presencia de genes que codifican resistencia a las principales familias de antibióticos usadas para el tratamiento de infecciones humanas y animales, como betalactámicos (qPCR TaqMan: *bla*<sub>TEM</sub>; PCR convencional: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>), sulfonamidas (qPCR TaqMan: *sulI*), tetraciclinas (qPCR TaqMan: *tet*(W)), macrólidos (qPCR SybrGreen: *erm*(B)), quinolonas (qPCR TaqMan: *qnrS*), colistina (PCR convencional: *mcr-1*) **(Berglund, Fick, & Lindgren, 2015; Calero-Cáceres et al., 2014, 2017; Calero-Cáceres & Muniesa, 2016; Colomer-Lluch, Jofre, & Muniesa, 2014; Lekunberri, Villagrasa, Balcázar, & Borrego, 2017; Marti, Variatza, & Balcázar, 2014a; Rodriguez-Mozaz et al., 2015; Stoll et al., 2012)**.

**Stoll et al. (2012)** evaluó la prevalencia de 24 de genes de resistencia frente a 8 antibióticos clínicamente relevantes ( $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, cloranfenícolos, tetraciclina, macrólidos, trimetoprima, y sulfonamidas) mediante la extracción de DNA total aislado de muestras de agua superficiales en Alemania y Australia. Los ARGs detectados con mayor frecuencia en mencionada muestras fueron *sulI*, *sulIII* (77–100%) y *dfrA1* (43–55%) genes que codifican para la resistencia a la sulfonamida y trimetoprim., además se halló una amplia distribución de ARG para  $\beta$ -lactámicos, macrolina, trimetoprim y cloranfenicol. Estudio que demuestra que un ecosistema acuático es un reservorio de ARGs que podrían transferirse potencialmente a patógenos humanos. La técnica de PCR convencional fue utilizada para la detección de ARGs en las muestras de aguas superficiales de este estudio.

**Calero-Cáceres et al. (2017)** evaluó la incidencia y persistencia de seis ARGs clínicamente relevantes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *qnrA*, *qnrS*, *mec(A)* y *sulI*) en sedimentos de un río mediterráneo en España, los cuales fueron cuantificados por ensayos Taqman qPCR, detectándose ARGs como *bla*<sub>TEM</sub> y *sulI* en mayor abundancia y en menor abundancia el gen *mecA*, Estudio en el que se demostró además que los ARGs pueden resistir durante largos períodos de tiempo en condiciones húmedas, secas o semisecas, por lo tanto los sedimentos pueden ser también un reservorio natural de ARGs.

El gen 16S rDNA se ha utilizado con la finalidad de normalizar los resultados de cuantificación de los ARGs y minimizar las varianzas causadas por las eficiencias totales de extracción y posibles degradaciones de los ácidos nucleicos en muestras de aguas y sedimentos (**E Marti, Variatza, & Balcázar, 2014b; Xiong, Sun, Ding, Zhang, & Zeng, 2014**).

**Zheng et al. (2018)** demostró la presencia de ARGs y ARBs mediante técnicas de qPCR y de secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rDNA después del tratamiento del agua potable urbana con carbón activado y cloro durante el proceso de desinfección, en donde se observó la influencia de biofilms en el carbón activado y la persistencia de ARGs como *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* frente a antibióticos clínicamente relevantes (beta-lactamasa y vancomicina) después de la cloración del agua potable convirtiéndose el agua potable en un sitio óptimo para la transferencia de ARGs, situación actual que amenaza la seguridad del agua para los residentes.

**Hembach et al. (2017)** determinó la prevalencia del gen de resistencia a la colistina *mcr-1* en siete plantas de tratamiento de aguas residuales mediante la técnica de qPCR, gen que actúa como mediador contra el antibiótico polimixina E, un antibiótico clínicamente relevante de última instancia. En el estudio se presentó en todas las muestras de aguas residuales recolectadas de las siete plantas tratamiento el gen de resistencia a la colistina *mcr-1*, los genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetM*, *bla<sub>CMY</sub>* y *ermB* también fueron hallados y cuantificados en mayor abundancias.

Las  $\beta$ -lactamasas de tipo *bla<sub>CTX-M</sub>*, es una familia de genes que otorgan resistencia a las cefalosporinas; habitualmente pueden movilizarse entre genomas bacterianos a través de integrones, transposones, plásmidos y cromosomas. Este gen es habitualmente detectado en bacterias Gram negativas con importancia clínica, en aguas residuales y en el ambiente (**Cantón et al, 2012; Colomer-Lluch, Calero-Cáceres, et al., 2014c; D'Andrea et al, 2013; Zhao & Hu, 2013**). Otras  $\beta$ -lactamasas consideradas como prioritarias desde el punto de vista epidemiológico son: *bla<sub>SHV</sub>*, gen resistente a cefalosporinas que ha evolucionado su resistencia a monobactams y carbapenems, gen codificado por plásmidos en Enterobacterias, las cuales se han encontrado en cultivos epidemiológicos de humanos, animales y en el medio ambiente, (**Liakopoulos, Mevius, & Ceccarelli, 2016**); *bla<sub>OXA-48</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>*, son genes resistentes a carbapenems, que son las últimas moléculas antibióticas desarrolladas, las cuales poseen el espectro más amplio de actividad (**Galler et al., 2014; Nordmann, Dortet, & Poirel, 2012**). Estos ARGs han sido detectados en la

familia Enterobacteriaceae, hallados en medios acuáticos contaminados alrededor del mundo (Poirel et al., 2012); *bla<sub>CMY</sub>*, es un gen resistente a cefalosporinas de cuarta generación, penicilinas potenciales y al ácido clavulánico que es un inhibidor de la  $\beta$ -lactamasas; su resistencia se debe a que está asociado con el gen AmpC (Heider et al., 2009).

Por lo expuesto, el presente estudio pretende investigar la presencia de ARGs en muestras de aguas superficiales, sedimentos de ríos y canales de riego, seleccionados de cinco provincias del país, para conocer el grado de impacto antropogénico que poseen.

## 12 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

- Evaluar la diseminación de genes de resistencia a antibióticos presentes en muestras de aguas superficiales, sedimentos de río y canales de agua de riego en cinco provincias del Ecuador.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Detectar y cuantificar cinco genes de resistencia a antibióticos (*sull*, *bla<sub>TEM</sub>*, *qnrS*, *ermB* y *tetW*), por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y del gen 16S rDNA en muestras de aguas y sedimentos de canales de agua de riego y ríos de cinco provincias del Ecuador.
- Detectar la presencia de 9 genes de resistencia a antibióticos (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *mcr-1*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>*) por medio de PCR convencional (PCR) en muestras de aguas y

sedimentos de canales de agua de riego y ríos de cinco provincias del Ecuador.

- Estimar las diferencias entre la frecuencia de detección de los genes de resistencia a antibióticos de acuerdo al origen y matriz evaluada.

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Materiales y equipos

##### Equipos de laboratorio

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Autoclave M11 Ultra Clave MIDMARK	1
Balanza analítica Cap. 150 g (1g)	1
Termociclador Life Technologies Simply Amp	1
Transiluminador UV enduro TM GDS Tower	1
Cámara de electroforesis OWL Easycast Thermo Scientific	1
Incubador bacteriológico	1
Mechero Bunsen	1
Nevera (4° C)	1
Congelador (-20°C)	1
Cabina de flujo laminar Bioseguridad 2 Thermo Scientific	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
<b>Instrumentos de laboratorio</b>	
Botellas de tapa azul de 100 mL	4 unidades
Botellas de tapa azul de 500 mL	1 unidad
Gradillas	3 unidades
Pipetas estériles graduadas de plástico de 25 mL	200 unidades

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
Puntas para micropipetas	100 unidades c/tipo
Tubos de micro centrifuga eppendorf	200 unidades
<b>Instrumentos de laboratorio</b>	
Tubos cónicos para centrifuga falcon	100 unidades
Kitasato con Büchner	1 unidad
Papel filtro HAWG047S6 S-Pak Filters 0.45 µm	80 unidades
Pinza metálica	1 unidad
<b>Reactivos de laboratorio</b>	
Caldo nutritivo LB (Luria Bertani)	25 gramos
Alcohol industrial al 95%	1 Litro
Agua Mili-Q	10 Litros
Agua destilada	1 Litro
Cloro	1 Litro
<b>Reactivos para PCR</b>	
Puntas de micropipeta de 10, 20, 200 y 1000 µL	300 unidades c/u
Microtubos eppendorf Micro Amp de 0.2 mL	1200 unidades
Ultrapure TM 10X TBE Buffer 1L Invitrogen	2 unidades
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	1 unidad
Marcador de peso molecular (Ladder 1000 pb)	1 unidad
Agarosa	60 gramos
<b>Reactivos para qPCR</b>	
Microtubos eppendorf Micro Amp de 0.2 mL	1200 unidades
TaqMan environmental MasterMix,	1 unidad
SYBR TM Green Master Mix	1 unidad

<b>Detalle</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Insumos</b>	Cantidad
Guantes de nitrilo de 100 pares	3 cajas
Cinta adhesiva	1 rollo
Gel antibacterial	1 fco
Jabón líquido	1 fco
Papel kraft	1 rollo
<b>Materiales de escritorio</b>	
Computadora	1
Cámara fotográfica	1
Bolígrafos	3 unidades
Marcador para CD	2 unidades
Cuaderno de laboratorio	1 unidad
Hojas de papel bond A4	1 paquete
Impresora	1

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Puntos de muestreo y toma de muestras**

#### **❖ Puntos de muestreo**

Los puntos de muestreo elegidos fueron considerados de acuerdo a los estudios realizados por el instituto nacional de investigación de salud pública INSPI y la Universidad Técnica de Ambato, considerando los datos proporcionados por el INEC-ESPAC y EPISIG sobre densidad poblacional, superficie agropecuaria, análisis de canales de riego, superficie con cultivos permanentes y transitorios. Se tomaron muestras en los siguientes puntos de interés detallados en la tabla 1.



**Tabla 1.** Puntos de muestreo Coordenadas geográficas de muestras de aguas y sedimentos de cinco provincias del Ecuador. (Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua)

Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	Coordenadas geográficas
Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo- Manabí	10/09/2018	0° 50' 04,1" S 80° 27' 35,2" W
Ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 46' 06,3" S 80° 01' 17,1" W
Río Ambato	Ambato- Tungurahua	24/10/2018	17 M 0763446
Río Milagro	Milagro- Guayas	03/10/2018	2° 06' 29,9" S 79° 30' 09,1" W
Ramal derivado del punto de captación Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	0° 52' 21,0" S 80° 06' 55,5" W
Río Machángara	Quito- Pichincha	13/08/2018	17 M 0787630
Ramal derivado de la local Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 46' 06,3" S 80° 01' 17,1" W
Río Daule	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 52' 01,3" S 79° 59' 12,8" W
Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	2° 14' 02,1" S 80° 07' 37,3" W
Ramal derivado del punto de captación del río Daule	Daule- Guayas	02/10/2018	1° 42' 26,8" S 80° 00' 38,7" W
Río Paula	Paula- Guayas	02/10/2018	1° 51' 52,8" S 79° 58' 12,8" W
Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	0° 53' 06,7" S 80° 27' 38,8" W
Ramal derivado del punto de captación del Carrizal del río Guayas	Guayaquil-Guayas	10/09/2018	2° 06' 39,3" S 79° 30' 04,3" W
Ramal derivado del punto de captación del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	0° 54' 38,0" S 80° 25' 26,7" W
Punto de captación del canal de Latacunga-río Cutuchi- Sector Cunchibamba	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	17 M 0766260
Punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	0° 53' 06,7" S 80° 27' 38,8" W
Punto de captación del canal Ambato- Huachi- Pelileo sector Terremoto	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	17 M 0765593
Desague del canal Latacunga- Salcedo Ambato	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	17 M 9767708
Punto de captación del canal del río Guachalá -Pifo	Quito- Pichincha	06/08/2018	17 M 0796829
Punto de captación del canal del río Patate	Patate- Tungurahua	03/09/2018	17 M 0777206
Tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 50' 47,0" S 80° 00' 39,8" W
Segundo Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	1° 04' 20,4" S 80° 25' 56,9" W
Río Pita- Tumbaco	Quito - Pichincha	13/08/2018	17 M 0789308
Punto de captación del río Tosagua	Tosagua- Manabí	10/09/2018	0° 48' 27,6" S 80° 13' 11,3" W
Segundo Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	0° 50' 04,1" S 80° 27' 35,2" W
Punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo	Salcedo- Cotopaxi	20/08/2018	17 M 0764935
Segundo ramal derivado del punto de captación del Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	0° 48' 36,3" S 80° 13' 17,2" W
Ramal derivado del punto de captación del Canal Ambato- Huachi Pelileo – Río Ambato	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	17 M 0765975
Segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 49' 41,4" S 80° 01' 32,7" W
Río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	1° 04' 20,4" S 80° 25' 56,9" W
Punto de captación del canal del río Guachal - Yaruqui	Quito- Pichincha	06/08/2018	17 M0799527
Río Cutuchi- Latacunga sector la FAE	Cotopaxi - Latacunga	20/08/2018	17 M 0764172
Segundo Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	2° 30' 24,0" S 80°20' 40,9" W
Río Daule	Daule - Guayas	02/10/2018	1° 52' 01,3" S 79° 59' 12,8" W
Punto de captación del canal del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	0° 57' 14,6" S 80° 26' 59,7" W
Canal de riego del sector Mundug	Patate - Tungurahua	03/09/2018	17 M 0777132
Río Guachalá- Cayambe	Cayambe - Pichincha	06/08/2018	17 M 0814772
Primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	1° 59' 01,2 " S 79° 59' 01,4" W
Río Cutuchi- Patate	Patate - Tungurahua	03/09/2018	17 M 0776212
Punto de captación del canal del río Daule	Nobol - Guayas	02/10/2018	1° 59' 01,2 " S 79° 59' 01,4" W

INSPI Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

Fuente: (Autor, 2019)

### ❖ Toma de muestras

Se recolectaron 40 muestras de aguas superficiales y 40 muestras de sedimentos de ríos de diferentes matrices, de cinco provincias del Ecuador por duplicado, (1000 mL cada una), en recipientes estériles los cuales se transportaron al laboratorio en hielo para evitar degradación en el DNA. Las cantidades de muestras, variaron de acuerdo al método de extracción y a la densidad de macromoléculas presentes en la muestra cómo se presenta en la tabla 2.

**Tabla 2.** Matriz y cantidades de muestra según el método de extracción y densidad de macromoléculas presentes.

<b>Matriz</b>	<b>DNA bacteriano</b>
<b>Agua de canales de riego</b>	100 mL
<b>Agua de rio</b>	100 mL
<b>Sedimentos</b>	0.25 g

**Fuente** (Autor, 2019)

### 2.2.2 Extracción de DNA bacteriano

#### ❖ Protocolo de extracción de DNA bacteriano para muestras líquidas (agua). Modificaciones realizadas al método QIAamp DNA blood Mini kit, Quiagen Inc., USA).

- Se filtró al vacío 100 mL de cada muestra de agua en un embudo Büchner por medio de filtros de diámetro de poro 0.45  $\mu\text{m}$  (47 mm, White gridded, EZ-Pak Membrane Filters, Millipore).
- Se realizó cuatro lavados con agua bidestilada estéril del embudo Büchner sin papel filtro, después del filtrado de cada muestra de agua.

- Se colocó 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) en frascos estériles de orina y se resuspendió los sólidos de las membranas, se agitó por vórtex a una velocidad de 3000 rpm por 1 minuto.
- Se colocó la biomasa sumergida en el caldo nutritivo en tubos falcon de 50 mL y se centrifugó a temperatura ambiente a una velocidad de 4000 rpm durante un tiempo de 10 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante de cada muestra centrifugada mediante el uso de pipetas graduadas estériles de plástico de 25 mL y se colocó la biomasa restante (10  $\mu$ L) en tubos de micro centrifuga – eppendorf para cada muestra.
- Se colocó la biomasa en tubos PowerBeads incluidos en el kit y se mezcló usando un vórtex de manera vigorosa.
- Se añadió 60  $\mu$ L de la solución C1 y se mezcló utilizando un vórtex
- Se colocó los tubos dentro del vórtex Mo-Bio de manera horizontal, se agitó a máxima velocidad durante 10 minutos.
- Se centrifugó los tubos a 10.000 XG durante 30 segundos a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga.
- Se añadió 250  $\mu$ L de la solución C2 y se agitó por vórtex durante 5 segundos, se incubó a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 XG. Se transfirió 600  $\mu$ L del sobrenadante a un nuevo tubo.
- Se añadió 200  $\mu$ L de la solución C3 y se mezcló cuidadosamente, se incubó a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 XG y se transfirió 750  $\mu$ L del sobrenadante a un nuevo tubo.
- Se mezcló la solución C4 antes de utilizar, se añadió 1200  $\mu$ L de la solución C4 al sobrenadante y se mezcló utilizando un vórtex por 5 segundos.
- Se colocó aproximadamente 675  $\mu$ L dentro del filtro provisto en el kit, y se centrifugó a 10.000 XG por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el líquido y se repitió el proceso hasta terminar el líquido.
- Se añadió 500  $\mu$ L de la solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 XG. Se descartó el flujo.
- Se centrifugó nuevamente a temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 XG.

- Cuidadosamente se colocó el filtro en un tubo de microcentrifuga limpio y se añadió 100 µL de la solución C6 al centro de la membrana. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 XG. Se descartó el filtro.
- Se almacenó el DNA en congelación entre -20°C y -80°C.

❖ **Protocolo de extracción de DNA Bacteriano para muestras sólidas (sedimentos)** (Powersoil DNA Isolation Kit, MoBio Lab, Inc, USA).

- Se añadió 0,25 g de muestra a tubos PowerBeards incluidos en el kit y se mezcló por vórtex vigorosamente.
- Se añadió 60 µL de la solución C1 y se mezcló por vórtex
- Se colocó los tubos dentro del vórtex Mo-Bio de manera horizontal y se agitó a máxima velocidad durante 10 minutos.
- Se centrifugó los tubos a 10.000 XG durante 30 segundos a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga.
- Se añadió 250 µL de la solución C2 y se agitó por vórtex durante 5 segundos. Se incubó a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 XG. Se transfirió 600 µL del sobrenadante a un nuevo tubo.
- Se añadió 200 µL de la solución C3 y se mezcló cuidadosamente, se incubó a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 XG y se transfirió 750 µL del sobrenadante a un nuevo tubo.
- Se mezcló la solución C4 antes de utilizar, se añadió 1200 µL de la solución C4 al sobrenadante y se mezcló utilizando un vórtex por 5 segundos.
- Se colocó aproximadamente 675 µL dentro del filtro provisto en el kit, y se centrifugó a 10.000 XG por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el líquido y se repitió el proceso hasta terminar el líquido.
- Se añadió 500 µL de la solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 XG y se descartó el flujo.
- Se centrifugó nuevamente a temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 XG.

- Cuidadosamente se colocó el filtro en un tubo de micro centrífuga limpio y se añadió 100 µL de la solución C6 al centro de la membrana. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 XG y se descartó el filtro.
- Se almacenó el DNA en congelación entre -20°C y -80°C.

### 2.2.3 Amplificación de genes de resistencia mediante la técnica de PCR convencional

Para la amplificación de genes de resistencia, se utilizó cepas control y primers detallados a continuación en la tabla 3 y 4 respectivamente.

**Tabla 3.** Cepas control utilizadas en la amplificación de los genes de resistencia

Control (Tipo de Gen)	BACTERIA
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>Escherichia coli</i> DH5α + pGEM ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ) Universidad de Barcelona-MARS
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>Citrobacter freundii</i> INSPI*
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> INSPI*
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i> INSPI*
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>Enterobacter cloacae</i> INSPI*
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> INSPI*
<i>mcr-1</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> INSPI*
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>Escherichia coli</i> DH5α + pGEM ( <i>bla</i> <sub>SHV</sub> ) Control interno

Control (Tipo de Gen)	BACTERIA
<i>bla<sub>CMY</sub></i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ + pGEM ( <i>bla<sub>CMY</sub></i> )
	Control interno

\*INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

Fuente: (Autor, 2019)

**Tabla 4.** Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR convencional.

Nº	GEN	SECUENCIA 5' - 3'	Referencia
19	KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	Poirel et al., 2011
20	KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	Poirel et al., 2011
31	NMD-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	Poirel et al., 2011
32	NMD-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	Poirel et al., 2011
25	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	Poirel et al., 2011
26	IMP-R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	Poirel et al., 2011
24	OXA 48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	Poirel et al., 2011
23	OXA 48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	Poirel et al., 2011
22	VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	Poirel et al., 2011
21	VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	Poirel et al., 2011
29	MCR1-F	GGGTGTGCTACCAAGTTTGC	Liu et al., 2016
30	MCR1-R	CATTGGCGTGATGCCAGTTT	Liu et al., 2016
38	CTX-M F	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	Pagani et al., 2003
37	CTX-M R	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	Pagani et al., 2003
39	SHV-F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	Dierikx et al., 2012
40	SHV-R	GATTTGCTGATTCGCTCGG	Dierikx et al., 2012
41	CMY-F	ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC	Dierikx et al., 2012
42	CMY-R	GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG	Dierikx et al., 2012

Fuente: (Autor, 2019)

Para la amplificación de los genes *mcr-1*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>* por medio de PCR convencional se utilizó una PCR multiplex con un volumen final de 12,5  $\mu\text{L}$ , para lo cual se siguió el protocolo que se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5.** Protocolo de PCR convencional para la amplificación de genes de resistencia

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Descripción</b>
DreamTaq Green	6,25 $\mu\text{L}$	DreamTaq DNA Polimerasa, tampón
PCR Master Mix		DreamTaq Green, $\text{MgCl}_2$ y desoxinucleótidos (dNTPs).
Primer-F	0,25 $\mu\text{L}$	Concentración: 10 $\mu\text{M}$
Primer-R	0,25 $\mu\text{L}$	Concentración: 10 $\mu\text{M}$
dd H <sub>2</sub> O	4,5 $\mu\text{L}$	Agua libre de nucleasas
DNA	1,25 $\mu\text{L}$	DNA bacteriano

**Fuente:** (Autor, 2019)

#### ❖ Preparación de soluciones de TBE 1 X y agarosa

##### **TBE 1 X**

- 1 Se colocó 100 mL de TBE 1 X. en 900 mL de agua bidestilada estéril
- 2 Se agitó la solución durante 1 minuto.

##### **Gel de agarosa**

- 1 Se colocó 1 g de agarosa grado molecular (1% p/v) en 70 mL de TBE 1 X en un frasco de tapa azul.

- 2 Se fundió la solución de agarosa (1% de TBE 1 X) en el microondas durante 1 minuto y se enfrió hasta alcanzar los 50°C.

❖ **Electroforesis en gel de agarosa**

1. Se añadió a la solución de agarosa (1% de TBE 1 X ) 3 µL de *SYBR® Safe DNA Gel Stain* y se homogenizó
2. Se colocó los peines en el soporte sellado para formar los pocillos del gel y se procedió a verter la solución de agarosa con *SYBR® Safe DNA Gel Stain*, se dejó polimerizar durante 15 minutos.
3. Se colocó el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis y se añadió TBE 1 X hasta cubrirlo.
4. Se agregó 3 µL del marcador de peso molecular (1000 pb), en el primer pocillo y 10 µL de los productos de PCR en los pocillos restantes.
5. Se conectó los electrodos a la fuente de alimentación y se corrió la electroforesis durante 60 minutos a 120 voltios y 400 mA.
6. Se Visualizó los fragmentos de DNA a través de UV (**Colomer-Lluch, Jofre, & Muniesa, 2011**).

**2.2.4 Amplificación y cuantificación de genes de resistencia mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR)**

❖ **Reacción de PCR cuantitativa (qPCR) mediante la técnica TaqMan para los genes *sull*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tet(W)*, *qnrS* y 16S rDNA**

La preparación de la reacción de PCR cuantitativa (qPCR), se realizó a partir del protocolo de qPCR detallado en la tabla 6.



**Tabla 6.** Protocolo de qPCR con sondas TaqMan

Reactivo	Cantidad (µL)	Descripción
Primer y Sonda	1	Primer 1 y primer 2: Conc. 18 µM. Sonda: Conc. 5 µM.
TaqMan	10	TaqMan Master Mix ambiental: 2.0.
Muestra	9	DNA bacteriano

**Fuente:** (Autor, 2019)

A continuación se siguió los siguientes pasos:

1. Se calculó el volumen a inocular del reactivo TaqMan y primer + sonda, para el número de muestras a analizar y se mezcló en un tubo eppendof.
2. Se transfirió 11 µL de la mezcla a cada pocillo de una placa óptica.
3. Se añadió a los pocillos de la placa un volumen de 9 µL de los estándares (3) y de cada muestra a investigar. El orden y la cantidad dependió de la cantidad de muestras a analizar, a continuación se presenta un esquema de la placa que se utilizó.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Blanco	Blanco							
B	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
C	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
D	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
E	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
F	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
G	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
H	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra

**Esquema 1.** Pocillos: placas de PCR y qPCR Thermo Fisher Scientific.

**Fuente:** (Autor, 2019)

- Se colocó la placa en el termociclador y se analizó la gráfica de amplificación.

❖ **Amplificación y cuantificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica SYBR-Green para el gen *ermB***

Se preparó la reacción de qPCR SYBR Green a partir del protocolo detallado en la tabla 7.

**Tabla 7.** Protocolo de qPCR SYBR Green

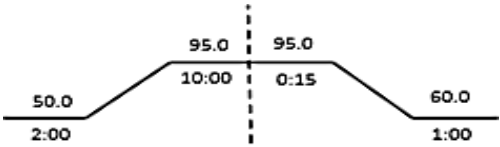
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Descripción</b>
Master Mix	5	PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix
Primer 1	0.25	Concentración: 10 pmol
Primer 1	0.25	Concentración: 10 pmol
Muestra	4.5	ADN bacteriano

- Se mezcló los componentes a fondo evitando la formación de burbujas y se centrifugó brevemente.
- Se transfirió 5.5  $\mu\text{L}$  de mezcla a cada pocillo de una placa óptica.
- Se selló la placa con una cubierta de adhesivo óptico
- Se colocó la placa en el termociclador y se analizó la gráfica de amplificación.

❖ **Condiciones de reacción para la técnica PCR cuantitativa (qPCR)**

Las condiciones de reacción de PCR cuantitativa (qPCR) que se utilizaron se detallan en la tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR)

PCR	CICLOS	REACCIÓN
Real- Time qPCR	25	

Los primers utilizados para la amplificación de genes de resistencia por qPCR se detallan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR)

GEN	PRIMER	SECUENCIA (5' - 3')	REFERENCIA
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	(Lachmayr, Cavanaugh, Kerkhof, DiRienzo, & Ford, 2009)
	LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	
	Sonda	6FMA-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ	
<i>sul1</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	(Modificado de Czekalski, Berthold, Caucci, Egli, & Burgmann, 2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT	
	Sonda	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ	
<i>tetW</i>	UP	CGGCAGCGCAAAGAGAAC	(Walsh et al., 2011)
	LP	CGGGTCAGTATCCGCAAGTT	
	Sonda	VIC-CTGGACGCTCTTAGG-MGBNFQ	
<i>qnrS</i>	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	(Colomer-Lluch et al., 2011)
	LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA	
	Sonda	GGCATTGTTGGAAACTTGCA	
16S rDNA	UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	(Nadkarni, Martin, Jacques, & Hunter, 2002)
	LP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
	Sonda	FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-MGBNFQ	
<i>ermB</i>	UP	GATACCGTTTACGAAATTGG	(J. Chen et al., 2007)
	LP	GATACCGTTTACGAAATTGG	

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 3.1.1 Análisis de los resultados

Este estudio fue realizado en el período Noviembre 2018 - Julio 2019, en el cual se tomaron 40 muestras de aguas y 40 muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos; el estudio arrojó los siguientes resultados:

- ❖ **Detección y cuantificación de cinco genes de resistencia a antibióticos (*sulI*, *bla*<sub>TEM</sub>, *qnrS*, *ermB* y *tetW*, por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y de los genes *int1* y 16S rDNA en aguas y sedimentos de cinco provincias del Ecuador. (Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua)**

En primer lugar, se presentan los resultados de las abundancias de ARGs de manera general en muestras de aguas y sedimentos por medio de box plots. Posteriormente, los resultados individuales de cada punto y matriz se presentan como abundancias relativas normalizadas con el gen 16S rDNA.

La Figura 1 presenta la abundancia de ARGs en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos. En el caso de las muestras de aguas provenientes de ríos, el gen con mayor abundancia (GC/mL) fue *int1* con un valor promedio de 6.13 log<sub>10</sub> GC/mL, el segundo gen más abundante fue *sulI* y el gen *ermB* con una abundancia alrededor de 4 log<sub>10</sub> GC/mL, los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *tetW* presentaron una abundancia alrededor de 3.72 log<sub>10</sub> GC/mL, mientras que el gen con menor abundancia fue *qnrS*

con un valor de  $2.94 \log_{10}$  GC/mL. El gen con mayor frecuencia fue *int1* ya que se encontró presente en el 100% de las muestras; los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* también presentaron una elevada tasa de detección del 91% y 82% respectivamente; El gen *ermB* se halló en una frecuencia del 73%, mientras que los genes *qnrS* y *tetW* fueron detectados en menor continuidad en las muestras con un valor del 64%. Sus abundancias continuaron siendo heterogéneas.

En las muestras de aguas provenientes de canales de riego, el gen que mayor abundancia (GC/mL) presentó fue nuevamente *int1* con una abundancia de  $5.54 \log_{10}$  GC/mL, con una abundancia moderada se encuentran los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *ermB* con un valor promedio de  $4 \log_{10}$  GC/mL, los genes, *sully* *tetW* presentaron una abundancia de  $3.5 \log_{10}$  GC/mL., mientras que el gen *qnrS* obtuvo una menor abundancia inferior a  $3 \log_{10}$  GC/mL. En cuanto a la frecuencia de detección de ARGs en las muestras, el gen *int1* se encontró presente en el 100% de las muestras los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* también presentaron una elevada tasa de detección del 93% y 90% respectivamente, hallándose en mayor frecuencia que en las muestras de aguas provenientes de ríos; El gen *qnrS* presentó una continuidad del 66% mientras que los genes *ermB* y *tetW* fueron detectados en menor frecuencia que las muestras de aguas de ríos con un 45% y 34% respectivamente.

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 1.** Box Plot con valores promediados  $\log_{10}$ GC/mL obtenidos de todos los ARG en el DNA presente en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos (C: Canales de riego; R: Ríos)

En la Figura 2 se detallan las abundancias y frecuencias de detección de ARGs en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos en donde se observa una frecuencia de detección similar a las obtenidas en las muestras de aguas (Figura 1), con densidades considerablemente altas en relación a las observadas en aguas, aunque sus frecuencias son inferiores. En el caso de las muestras de sedimentos provenientes de ríos, el gen más abundante continuó siendo *int1* con un valor de 8.46 log<sub>10</sub>GC/g, *ermB* con un valor también alto de 7.37 log<sub>10</sub>GC/g, los genes *tetW* y *sull* presentaron una abundancia alrededor de 6.8 log<sub>10</sub>GC/g, sin embargo los genes *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>* fueron los que menor abundancia presentaron con un valor de 5.63 log<sub>10</sub>GC/g. En cuanto a su frecuencia de detección, los genes *sull* e *int1* fueron positivos en el 100% de las muestras, los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *qnrS* presentaron una constancia de 73% y 64% respectivamente, mientras que los genes que menor tasa de detección obtuvieron fueron *tetW* y *ermB* con una frecuencia del 55% y 36% en las muestras.

En las muestras de sedimentos provenientes de canales de riego el gen con mayor abundancia fue *int1* con un valor de 7.98 log<sub>10</sub>GC/g, los genes *ermB*, *tetW* y *sull* se encontraron en segundo lugar con un valor promedio de 6.5 log<sub>10</sub>GC/g, los genes restantes *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>*, presentaron una abundancia menor correspondientes a 5.7 log<sub>10</sub>GC/g. Los genes más frecuentes en las muestras fueron *sull* e *int1* con un porcentaje de detección del 100%, sin embargo, los genes *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW*, *ermB* y *qnrS* se detectaron en menor continuidad que en las muestras de sedimentos provenientes de ríos con frecuencias del 31%, 34%, 34% y 21% respectivamente.

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 2.** Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC/g$ ) obtenidos de todos los ARG en el DNA presente en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos (C: Canales de riego; R: Ríos)

La Figura 3 detalla la abundancia general de ARGs en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos de las provincias de: Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua. Los genes *int1*, *sull* y *ermB* presentaron una mayor abundancia en la provincia de Tungurahua con valores de 5.85, 4.57 y 5.89 ( $\log_{10}GC/mL$ ) respectivamente, los genes *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>* se presentaron con mayor abundancia en la provincia del Guayas con 2.70 y 5.25 ( $\log_{10}GC/mL$ ) respectivamente, *tetW* fue el gen más abundante en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua con un valor de 4  $\log_{10}GC/mL$ . En cuanto a las frecuencias de detección en las muestras, el gen *int1* obtuvo una prevalencia del 100%, en segundo lugar se encuentran los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* con una tasa de detección promedio por provincias correspondiente al 91% y con abundancias heterogéneas; de manera específica en las provincias de Manabí y Cotopaxi el gen *sull* prevaleció en el 100% de las muestras, el gen *bla<sub>TEM</sub>* se detectó con mayor frecuencia en las provincias de Pichincha y Cotopaxi con un 100%, el gen correspondiente a quinolonas *qnrS* se cuantificó con mayor frecuencia en la provincia de Cotopaxi con un 100% y con menor frecuencia en la provincia de Manabí con un 36%, los genes con menor frecuencia de detección a nivel general para las cinco provincias fueron *tetW* y *ermB* con una prevalencia promedio cercana al 60%, sin embargo de manera específica el gen *tetW* fue detectado con mayor asiduidad en las muestras de la provincia de Cotopaxi con un 75% y el gen *ermB* en la provincia de Pichincha con un 80%.

En la Figura 4 se detallan las abundancias generales de ARGs en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos de las provincias de: Manabí, Guayas, Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua, en la cual se observa una tendencia similar a las prevalencias y abundancias de ARGs obtenidas en las muestras de aguas a nivel de provincias (Figura 3), sin embargo los valores obtenidos para las muestras de sedimentos fueron considerablemente inferiores en cuanto a frecuencias, pero con



densidades considerablemente altas. Los genes que se encuentran con mayor abundancia fueron: *int1* y *sull* en la provincia de Tungurahua y Cotopaxi con un valor alrededor de 9 y 8 log<sub>10</sub>GC/g respectivamente; *qnrS* en la provincia de Guayas y Pichincha con una abundancia alrededor de 6 log<sub>10</sub>GC/g, el gen *bla*<sub>TEM</sub> se cuantificó con mayor abundancia en las provincias de Guayas, Pichincha y Tungurahua con un valor alrededor de 5 log<sub>10</sub>GC/g, *tetW* y *ermB* obtuvieron mayor abundancia en la provincia de Tungurahua con un valor alrededor de 7 log<sub>10</sub>GC/g. Los genes más frecuentes en las muestras de las cinco provincias fueron el gen *int1* y *sull* con una prevalencia y abundancia del 100%, en segundo lugar se encuentra el gen *tetW* con una frecuencia de detección del 55%, sin embargo de manera específica en la provincia de Pichincha el gen *tetW* se encuentra en mayor frecuencia con una tasa de detección del 100%.

Los genes *bla*<sub>TEM</sub> y *ermB* presentaron una frecuencia promedio a nivel general de provincias del 46%, ambos genes se encuentran de manera específica con una mayor persistencia en las muestras de la provincia de Cotopaxi con un porcentaje de detección del 75%. El gen de resistencia a quinolonas (*qnrS*), se detectó con una frecuencia inferior al 55% a nivel general de provincias, sin embargo de manera específica existe una mayor frecuencia de detección de ARGs en las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Tungurahua con un valor correspondiente a 45%.

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 3.** Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC/mL$ ) obtenidos de todos los ARGs en el DNA presente en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos por provincias (M: Manabí, G: Guayas, P: Pichincha, C: Cotopaxi, T: Tungurahua).

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 4.** Box Plot con valores promediados ( $\log_{10}GC/g$ ) obtenidos de todos los ARGs en el DNA presente en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos de cinco provincias del Ecuador (M: Manabí, G: Guayas, P: Pichincha, C: Cotopaxi, T: Tungurahua).

La Figura 5 muestra las abundancias de ARGs normalizadas con el gen 16S rDNA en diferentes puntos de muestreo de aguas tomadas de canales de riego, en donde todas las muestras fueron positivas para uno o más genes. El gen que mayor abundancia presentó fue *int1*, el cual indica la existencia de una elevada posibilidad de procesos de transferencia horizontal genética, los genes *sull*, *ermB*, *bla<sub>TEM</sub>* y *tetW* presentaron una abundancia también considerable, mientras que el gen con menor abundancia fue *qnrS* con un valor de 0.67 log<sub>10</sub>/mL.

Los puntos que presentaron una mayor abundancia y diversidad fueron: en primer lugar el ramal derivado del punto de captación del canal Ambato- Huachi Pelileo del sector del río Ambato, el cual superó en abundancias el octavo logaritmo en relación al resto de provincias. En segundo lugar se encuentra el punto de captación del canal del río Guachalá-Yaruqui el cual superó el sexto logaritmo (7.8 log<sub>10</sub>/mL), en tercer lugar se encuentran: el canal de riego del río Portoviejo, el punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo, el ramal derivado de la local Santa Lucía y el ramal derivado del punto de captación del carrizal del río Guayas, los cuales presentaron abundancias similares alrededor de 6-6.5 log<sub>10</sub>/mL. Los canales restantes no superaron el quinto logaritmo en abundancias, lo que quiere decir que estos presentan contaminación con ARGs relevantes pero en menor abundancia. El canal de agua del sector Mundug presentó menor contaminación con ARGs por encontrarse aguas arriba, el cual no superó en abundancia al primer logaritmo.

La Figura 6 presenta las abundancias de ARGs en diferentes puntos de muestreo de aguas tomadas de ríos. El gen que mayor abundancia presentó fue *int1*, en segundo lugar el gen más abundante fue el gen *tetW*, los genes *ermB*, *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* presentaron una abundancia moderada, mientras que en el gen *qnrS* se cuantificó una menor abundancia.

Los puntos que presentaron una mayor abundancia y diversidad fueron los ríos de la provincia de Pichincha: el río Pita- Tumbaco, río Machángara y el río Ambato de la

provincia de Tungurahua con abundancias que superaron el quinto logaritmo (5.5-6.3  $\log_{10}/\text{mL}$ ), el agua de los ríos restantes presentaron abundancias similares alrededor de 4  $\log_{10}$ . El punto con menor abundancia fue el agua del río Portoviejo ya que no superó al segundo logaritmo.

La Figura 7 muestra las abundancias de ARGs con un valor normalizado del gen 16S rDNA en diferentes puntos de muestreo de sedimentos tomadas de canales de riego. El gen que se cuantificó con una abundancia mayor fue *int1*, en segundo lugar se encuentran los genes *ermB* y *tetW* con una abundancia mayor a la de los genes *sull* *bla*<sub>TEM</sub> y *qnrS*, los cuales obtuvieron una menor abundancia en las muestras.

Los puntos que presentaron una mayor abundancia y diversidad fueron: el canal de riego del río Portoviejo por superar el octavo logaritmo y punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo por superar el séptimo logaritmo, en segundo lugar se encuentran: el canal Ambato- Huachi Pelileo del sector del río Ambato, punto de captación del canal Latacunga-río Cutuchi y el segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía-Guayas por presentar una abundancia alrededor de 6-7  $\log_{10}/\text{g}$ . Los puntos restantes no superaron el quinto logaritmo; el punto con menor abundancia fue el primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía con una abundancia de 1.2  $\log_{10}/\text{g}$ .

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 5.** Diagrama de barras que representa las abundancias relativas de ARGs en muestras de aguas de canales de riego (valor normalizado 16S rDNA)

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 6.** Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de aguas de ríos. (valor normalizado 16S rDNA)

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 7.** Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de sedimentos de canales de riego (valor normalizado 16S rDNA)

La Figura 8 muestra las abundancias de ARGs presentes en sedimentos de ríos, *int1* presentó nuevamente una mayor abundancia en las muestras, en segundo lugar los genes más abundantes fueron: *ermB* y *tetW*, en tercer lugar se encuentra el gen *sull*, y por último los genes *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>*, por presentar una abundancia menor en las muestras.

Los puntos que mayor abundancia y diversidad presentaron fueron: el río Machángara, río Cutuchi- Patate y el río Ambato con abundancias alrededor de 6-7  $\log_{10}/g$ , los cuales son ríos que presentan un nivel antropogénico alto, en segundo lugar pero no menos importantes están los sedimentos del río Cutuchi- Latacunga sector la FAE y del río Guachalá- Cayambe con abundancias similares de 6  $\log_{10}/g$ , sedimentos contaminados con ARGs en mayor medida que el resto de sedimentos por no superar el cuarto logaritmo. El sedimento con menor abundancia fue el del río Portoviejo, el cual no superó el segundo logaritmo.

**Figura con contenido restringido. Favor comunicarse con el Quím. William Calero Cáceres ([wr.calero@uta.edu.ec](mailto:wr.calero@uta.edu.ec)).**

**Figura 8.** Diagrama de barras que representa las abundancia relativas de ARGs en muestras de sedimentos de ríos (Valor normalizado 16S rDNA)

❖ **Detección de la presencia de 9 genes de resistencia a antibióticos (*bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>*, *mcr-1*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>KPC</sub>*) por medio de PCR convencional (PCR)**

En la Tabla 10 y en el Anexo B, se muestra la presencia de ARGs mediante la técnica de PCR en muestras de aguas de canales de riego y de ríos. Se detectó una mayor presencia de genes en los siguientes puntos: En el ramal derivado del punto de captación Naranjito y en el ramal derivado del punto de captación del Canal Ambato-



Huachi Pelileo – río Ambato, en los cuales se presentaron los genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>*, en el río Machángara de la provincia Pichincha se detectaron los genes *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>OXA-48</sub>* y en el río Daule los genes *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>*. Otros puntos con amplificaciones positivas de estos genes fueron: El tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía, en el cual se encuentra presente el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* y el segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía con la presencia del gen *bla<sub>KPC</sub>*, en los puntos restantes no existe la presencia de ARGs en las muestras de aguas.

En la Tabla 11 y en el Anexo B, se detalla la presencia de ARGs en sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos. Se detectó una mayor presencia de genes en el río Machángara con *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>*, una menor presencia de genes se detectó en los siguientes puntos: En el canal de riego del río Portoviejo y en el río Ambato se encontró presente el gen *bla<sub>KPC</sub>* mientras que en el ramal derivado del punto de captación Naranjito se presentó el gen *bla<sub>CMY</sub>*, el gen *bla<sub>OXA-48</sub>* se presentó en el ramal derivado del punto de captación del carrizal del río Guayas, el gen *bla<sub>KPC</sub>* fue positivo en el punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo.

**Tabla 10.** Presencia de ARGs en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos mediante la técnica de PCR convencional.

N°	Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	<i>mcr-1</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>
1	Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Río Ambato	Ambato- Tungurahua	24/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Río Milagro	Milagro- Guayas	03/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ramal derivado del punto de captación carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Río Machángara	Quito- Pichincha	13/08/2018	-	-	+	-	-	-	+	-	+
7	Ramal derivado de la local Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Río Daule	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	-	+	+	-	-	-	+	+	+
10	Ramal derivado del punto de captación del río Daule	Daule- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Río Paula	Paute- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Ramal derivado del punto de captación del carrizal del río Guayas	Guayaquil-Guayas	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Ramal derivado del punto de captación del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Punto de captación del canal de Latacunga-río Cutuchi	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Punto de captación del canal Ambato- Huachi- Pelileo sector Terremoto	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Desague del canal Latacunga- Salcedo Ambato	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Punto de captación del canal del río Guachalá -Pifo	Quito- Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Punto de captación del canal del río Patate	Patate- Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	Segundo ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Río Pita- Tumbaco	Quito - Pichincha	13/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Punto de captación del río Tosagua	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Segundo canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo	Salcedo- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Segundo ramal derivado del punto de captación del carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Ramal derivado del punto de captación del canal Ambato- Huachi Pelileo – Río Ambato	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	-	-	+	-	-	-	+	+	+

N°	Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	<i>mcr-1</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>
29	Segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	+	-	-
30	Río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Punto de captación del canal del río Guachalá - Yaruqui	Quito- Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Río Cutuchi- Latacunga sector la FAE	Cotopaxi - Latacunga	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Segundo Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Río Daule	Daule - Guayas	02/10/2018	-	-	+	-	-	-	+	-	+
35	Punto de captación del canal del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Canal de riego del sector Mundug	Patate - Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Río Guachalá- Cayambe	Cayambe - Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Río Cutuchi- Patate	Patate - Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	Punto de captación del canal del río Daule - Nobol	Nobol - Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 11.** Presencia de ARGs en muestras de sedimentos de canales de riego y de ríos mediante la técnica de PCR convencional

N°	Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	<i>mcr-1</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>NIM</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>
1	Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	Ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Río Ambato	Ambato- Tungurahua	24/10/2018	-	-	-	-	-	-	+	-	-
4	Río Milagro	Milagro- Guayas	03/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ramal derivado del punto de captación carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Río Machángara	Quito- Pichincha	13/08/2018	-	-	+	-	-	-	+	-	-
7	Ramal derivado de la local Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Río Daule	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	Ramal derivado del punto de captación del río Daule	Daule- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Río Paula	Paute- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Ramal derivado del punto de captación del carrizal del río Guayas	Guayaquil-Guayas	10/09/2018	-	-	+	-	-	-	-	-	-
14	Ramal derivado del punto de captación del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Punto de captación del canal de Latacunga-río Cutuchi	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Punto de captación del canal Ambato- Huachi- Pelileo sector Terremoto	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Desague del canal Latacunga- Salcedo Ambato	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Punto de captación del canal del río Guachalá -Pifo	Quito- Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	Punto de captación del canal del río Patate	Patate- Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Segundo ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Río Pita- Tumbaco	Quito - Pichincha	13/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Punto de captación del río Tosagua	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Segundo canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	Punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo	Salcedo- Cotopaxi	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	+	-	-
27	Segundo ramal derivado del punto de captación del Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	Ramal derivado del punto de captación del Canal Ambato- Ambato-Huachi Pelileo – río Ambato	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N°	Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	<i>mcr-I</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>CMY</sub>
29	Segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	Río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Punto de captación del canal del río Guachalá - Yaruqui	Quito- Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Río Cutuchi- Latacunga sector la FAE	Cotopaxi - Latacunga	20/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Segundo ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Río Daule	Daule - Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Punto de captación del canal del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Canal de riego del sector Mundug	Patate - Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Río Guachalá- Cayambe	Cayambe - Pichincha	06/08/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Río Cutuchi- Patate	Patate - Tungurahua	03/09/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	Punto de captación del canal del río Daule - Nobol	Nobol - Guayas	02/10/2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.1.2 Discusión de los resultados

#### ❖ Cuantificación de ARGs mediante qPCR en muestras de agua y sedimentos de ríos y canales de agua de riego

Los ARGs son considerados contaminantes emergentes, cuyas densidades se encuentran relacionadas directamente al impacto antropogénico recibido; por ejemplo, el originado por la crianza de animales (Zhu et al., 2013), el uso de agroquímicos en la agricultura (Negreanu et al., 2012) y por aguas residuales no tratadas (Yang et al., 2012) que liberan determinantes de resistencia a antibióticos como ARBs, ARGs, antibióticos y sus metabolitos, los cuales modifican la estructura de los microbiomas receptores. En este estudio, se evaluó la presencia y densidades de cinco ARGs (*sull*, *qnrS*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW* y *ermB*) mediante la técnica de qPCR, debido a su relación con antibióticos utilizados comúnmente en la ganadería, agricultura y con fines clínicos, los cuales han sido detectados en aguas y sedimentos provenientes de ríos y canales de riego impactados por la actividad humana alrededor del mundo (Calero-Cáceres et al., 2017; Luo et al., 2010; Pei et al., 2006; Rodríguez-Mozaz et al., 2015). Además, se cuantificó la presencia del gen integrasa 1 (*int1*), el cual actúa como un indicador de la existencia de una elevada posibilidad de procesos de transferencia genética horizontal. Como gen normalizador de la abundancia de ARGs y las densidades bacterianas presentes en la muestra, se cuantificó también el gen 16S rDNA, presentado en el Anexo A de este estudio. Todas las muestras resultaron positivas para uno o varios ARGs seleccionados, sin embargo, la abundancia y la frecuencia para cada gen varió según la influencia antropogénica de cada punto de muestreo.

En las aguas provenientes de ríos y canales de riego, los ARGs con mayor abundancia en este estudio fueron: *sull*, el cual es un gen ampliamente diseminado en microorganismos de origen clínico, ambiental y animal (Czekalski, Berthold, Caucci, Egli, & Bürgmann, 2012; Sabri et al., 2018; Stange et al., 2019); el gen *ermB*, que codifica resistencia a macrólidos y generalmente se encuentra en elementos genéticos conjugativos (Negreanu et al., 2012); *bla<sub>TEM</sub>* que codifica

resistencia a  $\beta$ -lactámicos, se encuentran en los plásmidos y pueden asociarse con transposones e integrones (Lachmayr et al., 2009) y *tetW*, que codifica resistencia a tetraciclinas, mientras que el gen con menor abundancia fue *qnrS*, el cual codifica resistencia a quinolonas debido a la acumulación de mutaciones en los genes bacterianos (Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2014).

Existe una mayor abundancia de ARGs en el agua proveniente de ríos que en las muestras de aguas provenientes de canales de riego, al encontrarse entre 0.5 y 1  $\log_{10}$  por encima de aquellas abundancias cuantificadas en el agua de canales (Figura 1); este patrón también es observado en las muestras de sedimentos (Figura 2); sin embargo, las muestras de sedimentos, de manera general, presentaron una mayor abundancia de ARGs en relación a las muestras de aguas, en donde el promedio de las abundancias fue de aproximadamente 2  $\log_{10}$  por encima del detectado en aguas (Figura 1 y 2). Esta diferencia fue observada también en un estudio realizado en el río Llobregat (España), en donde la remoción de los mismos por eventos climáticos, influencia de manera directa las densidades de ARGs en aguas (Calero-Cáceres et al., 2017). Otro estudios han demostrado que el cambio climático, la influencia antropogénica y la presencia de DNA extracelular en suelos, sedimentos y en el agua, pueden influenciar en las densidades de ARGs, por lo que se deduce que los sedimentos pueden representar un potencial reservorio de ARGs en cuencas de agua (Baquero, Martínez, & Cantón, 2008; Nagler, Insam, Pietramellara, & Ascher-Jenull, 2018).

En estudios realizados en España entre 2013 y 2016 en muestras de aguas y sedimentos de ríos, se detectaron densidades inferiores de genes de resistencia a antibióticos en sus aguas en relación con muestras de aguas residuales de estaciones depuradoras (Calero-Cáceres et al., 2014, 2017); sin embargo, las densidades de genes de resistencia a antibióticos obtenidas en este estudio fueron mayores en el caso de *bla<sub>TEM</sub>* y *sul1* para las muestras de ríos, en donde se obtuvo una abundancia de 1 a 2  $\log_{10}$  por encima de las densidades detectadas en España, lo que indica que nuestros ríos poseen niveles de contaminación mucho más elevados, debido a la falta

de cobertura de sistemas de tratamiento de aguas residuales. En el caso del gen *qnrS*, la densidad detectada en aguas de ríos fue de 0,5 a 1 log<sub>10</sub> (Figura 1), por debajo del reportado en las aguas de ríos en España. Este efecto puede deberse a diferencias en los perfiles de resistencia o de uso de antibióticos en cada población, lo cual disminuye la diseminación de resistencias a mencionado gen. Este efecto se pudo observar en una comparación entre muestras de aguas residuales europeas y africanas (**Colomer-Lluch, Calero-Cáceres, et al., 2014b**).

En el caso de los sedimentos de ríos (Figura 2), los ARGs detectados en este estudio fueron menores a los detectados en el estudio de **Calero-Cáceres et al., 2017**, a excepción del gen *sull*, el cual se presentó con una densidad de 1 a 2 log<sub>10</sub> por encima de los detectados en los sedimentos de los ríos de España. En el río Haihe en China también se detectaron densidades relativamente altas de *sull* en sedimentos (alrededor de 7,8 log<sub>10</sub>/g) (**Y. Luo et al., 2010**); siendo estas más altas que las densidades detectadas en los ríos ecuatorianos analizados. El gen *sull* ha sido detectado en mayor abundancia en ríos, acequias, lagunas, sedimentos y en plantas de tratamientos, en donde su aparición está relacionada con la presión ejercida en comunidades bacterianas por residuos del antibiótico sulfonamida en el agua y suelo (**Zhang et al., 2009**).

En este estudio, se cuantificó además las densidades de *tetW* en sedimentos y aguas provenientes de ríos y de canales de riego, en los cuales los sedimentos triplicaron las densidades de aquellas detectadas en aguas. Esta diferencia probablemente fue debido a la existencia de una mayor población de bacterias en los sedimentos, ya que como se observa en el Anexo A, las densidades del gen 16S rDNA en los sedimentos fueron mucho más altas que en las muestras de aguas. Las densidades cuantificadas para *tetW* fueron mayores en relación a un estudio realizado sobre la acumulación de ARGs en aguas y sedimentos del río Perla en China, (**B. Chen, Liang, Huang, Zhang, & Li, 2013**), y en el río Haihe en China (**Y. Luo et al., 2010**), en donde el gen *tetW* se encontró casi ausente en las muestras, lo que implica que las aguas y sedimentos de ríos del Ecuador presentan cantidades considerables del gen de



resistencia *tetW*, asociado a la familia de antibióticos de las tetraciclinas, los cuales son utilizados con fines clínicos humanos y veterinarios (Pei et al., 2006). Estudios previos también han encontrado el gen *tetW* en el agua potable tratada y en aguas residuales recicladas (Pruden, Pei, Storteboom, & Carlson, 2006), por lo que se deduce que estos medios podrían representar vías potenciales para la diseminación de ARGs dentro de la cadena alimentaria ya que presentan una elevada persistencia frente a tratamientos de potabilización y desinfección. Es por tal motivo que es necesario abordar la cuestión de la difusión de los ARG en el medio ambiente, con la finalidad de detectar reservorios y reducir la diseminación de estos determinantes.

La Figura 3 y 4 presenta la distribución de los cinco ARGs seleccionados en aguas y sedimentos de ríos y canales de riego a nivel de provincias. De manera general, en donde se observa que los sedimentos presentan mayores densidades de ARGs debido a que se encuentran entre 1 y 2  $\log_{10}$  por encima del detectado en las muestras de aguas. En el caso de las aguas, de manera general el gen *sull* y *tetW* se encontraron en mayor concentración en las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, el gen *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>* en Guayas y el gen *ermB* en Tungurahua mientras que en los sedimentos *sull* se encontró mayormente presente en Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua, el gen *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>* en Pichincha y Guayas y el gen *tetW* y *ermB* en Tungurahua.

Se cuantificó además el gen integrasa (*intI*), el cual fue el más abundante en todas las muestras. La presencia de este gen indica la existencia de una elevada posibilidad de procesos de transferencia genética horizontal (Di Cesare et al., 2016); las concentraciones de *intI* en las muestras de aguas y sedimentos variaron en cada punto de muestreo (Figura 1-4). Estudios realizados por Marti et al., 2014b; Rosewarne et al., 2010 y Wright et al., 2008, sobre las abundancias del gen *intI* en comunidades bacterianas y en ecosistemas acuáticos, han demostrado que las densidades de *intI* aumentan como consecuencia de un impacto antropogénico en ecosistemas contaminados con metales pesados como mercurio, zinc, plomo y cobre; lo que indica que las aguas y sedimentos de ríos y canales de riego de las cinco provincias del Ecuador podrían representar un reactor para la evolución y difusión de

ARGs debido a la influencia antropogénica que reciben (**Wright et al., 2008**). La presencia de integrasa (*int1*) puede facilitar que los ARGs puedan transformarse en diferentes medios ambientales y aumentar la probabilidad de generar microorganismos con resistencia a antibióticos en bacterias entéricas (**Berglund et al., 2014; Stoll et al., 2012**).

#### ❖ **Abundancia relativa (ARGs/16S normalizado) por punto de muestreo**

Con la finalidad de ajustar las abundancias de los ARGs frente a la cantidad de DNA extraído, se utilizaron valores normalizados del gen 16S rDNA, con el fin de obtener las abundancias relativas para cada punto de muestreo. La Figura 5 y 6 presentan las abundancias relativas de ARGs en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos, mientras que la Figura 7 y 8 presentan las abundancias relativas de ARGs en muestras de sedimentos para las cinco provincias del Ecuador,

El plan de riego de la provincia de Tungurahua y un reporte de investigación publicado en un periódico local, detallan que las aguas provenientes del río Ambato se encuentran contaminadas en un 83%, con residuos municipales e industriales (**Diario La Hora, 2018; Gobierno Provincial de Tungurahua, 2014**). En esta provincia, el punto que presentó una mayor abundancia relativa con los cinco ARGs seleccionados fue el agua del ramal derivado del punto de captación del canal Ambato-Huachi-Pelileo, el cual superó en total el octavo logaritmo, en donde *sull*, *ermB*, *bla<sub>TEM</sub>* y *tetW* presentaron abundancias relativas alrededor de 1.4 log<sub>10</sub> y 1.50 log<sub>10</sub> en el gen *tetW* en el sedimento del canal. Los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* en este estudio presentaron un número de copias genómicas normalizadas menor a las obtenidas en un estudio realizado en el río Tai-China (**Stange et al., 2019**). La alta detección de *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* en el agua del canal pudo haber sido causado por la asociación con integrones de clase 1, que actúan como portadores de ARGs en el medioambiente (**B. Chen et al., 2015**); El gen de resistencia a quinolonas *qnrS*, se cuantificó con una abundancia baja de 0.5 log<sub>10</sub> en el canal de agua y una abundancia de 0.90 log<sub>10</sub> en canal del sedimento, en relación al valor obtenido en estudios realizados en aguas residuales y ríos urbanos en España (10<sup>2</sup>-10<sup>6</sup> log/mL)

(Colomer-Lluch et al., 2014; Proia et al., 2018). Esto podría deberse a un potencial menor de prevalencia de resistencia a quinolonas en el país. El canal Ambato-Huachi-Pelileo, capta las aguas provenientes del río Ambato, agua de río que también presentó una abundancia relativa de ARGs total alta de aproximadamente  $5,6 \log_{10}$ , en donde el gen *ermB*, que generalmente se encuentra en elementos genéticos conjugativos (Rodríguez-Mozaz et al., 2015), presentó una abundancia relativa de  $1,32 \log_{10}$ , mayor a la obtenida en *sull*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW* y *qnrS* que presentaron una abundancia promedio de  $0,8 \log_{10}$ , pero baja en relación al sedimento del río que obtuvo una abundancia de  $1,89 \log_{10}$ ; cuyas densidades son menores a las cuantificadas en un estudio realizado en el río Funan-China ( $3 \log_{10}$ ), (Tuo et al., 2018). El agua del río Ambato se distribuye por los canales de riego del sector Benítez, Cevallos, Montalvo y Terremoto; en el canal de riego de Terremoto, la abundancia relativa total disminuyó a los  $3 \log_{10}$ , presenciándose los genes *sull* con una abundancia de  $0,71 \log_{10}$ ; *bla<sub>TEM</sub>* y *qnrS* con una abundancia relativa promedio de  $0,5 \log_{10}$ , mientras que en el sedimento del canal en mayor abundancia se presentó *tetW* y *ermB* con un valor alrededor de  $1,6 \log_{10}$ , cerca del canal se evidenció criaderos de animales y viviendas. Uno de los factores que pudieron influenciar este descenso de densidades de ARGs en el agua, está el de la dilución de los contaminantes, los cuales a un mayor caudal tienden a disminuir su concentración en los cuerpos de agua (Calero-Cáceres et al., 2017).

El canal de riego del sector Mundug-Patate por encontrarse aguas arriba, solo presentó contaminación por el gen *qnrS* en el agua, con una abundancia relativamente baja de  $0,6 \log_{10}$  y *sull* con un valor de  $0,75 \log_{10}$  en el sedimento del canal. Alrededor de este canal, la influencia antropogénica es mínima; sin embargo, en el mismo canal de riego, aguas abajo (zona centro de Patate), la abundancia relativa de ARGs total aumentó a  $4 \log_{10}$ , en especial por el aporte del gen *sull* ( $1,16 \log_{10}$  en el agua y  $0,98 \log_{10}$  en el sedimento), mientras que en menor abundancia, en el agua del canal, se presentaron los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *qnrS*, con un valor alrededor de  $0,85 \log_{10}$ , aduciendo un aumento en estas densidades a la influencia de la población sobre la calidad del agua.

Un caso que merece atención es el del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, el cual atraviesa las provincias de Cotopaxi y Tungurahua. Este canal capta las aguas del río Cutuchi, el cual actúa como receptor de aguas servidas, desechos domésticos, industriales y hospitalarios. Esta agua es utilizada principalmente con fines agrícolas (**Diario el telégrafo, 2015**). En este estudio, el agua del río Cutuchi, antes de atravesar el casco urbano de Latacunga (sector la FAE), (Figura 6), presentó una abundancia relativa total de  $4.3 \log_{10}$ , en donde el gen de resistencia a eritromicina *ermB*, obtuvo una mayor abundancia relativa con un valor de  $1.25 \log_{10}$ ; los genes de resistencia a tetraciclina y sulfonamida *tetW* y *sull*, presentaron una abundancia moderada alrededor de  $0.9 \log_{10}$ , mientras que *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>* obtuvieron una abundancia menor correspondiente a  $0.4 \log_{10}$ . En sedimentos, estas abundancias de ARGs son mayores a las observadas en el agua (Figura 8), el cual es un indicador del rol de los sedimentos como reservorios de ARGs en el medio ambiente.

En el punto del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, ubicado en San Andrés de Pitaló, presentó una abundancia relativa total mayor a la del río Cutuchi (antes de Latacunga) y la del punto de captación ubicada en el sur de esta ciudad, con un valor aproximado de  $6 \log_{10}$ ; relacionando este aumento a la elevada contaminación recibida a lo largo de su cuenca. En el desagüe de este canal (Tungurahua), las abundancias relativas disminuyeron hasta un aproximado de  $3 \log_{10}$ , efecto que puede atribuirse al factor de dilución y a la inactivación natural de estos genes (**Andersson & Hughes, 2011; Calero-Cáceres & Muniesa, 2016**). En un estudio realizado en China se describió que los genes *sull*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW* y *ermB*, son detectados frecuentemente en lugares que presentan un mayor grado de urbanización (**Ling, Yang, Huang, Zou, & Luan, 2013**).

El agua del río Cutuchi posee densidades variables pero altas de ARGs a lo largo de su cuenca. En su paso por Patate (Tungurahua), se detectó una abundancia relativa total aún mayor a la del río Cutuchi del sector la FAE, con un valor de  $4.47 \log_{10}$ ; en donde, el gen *ermB* se presentó aun en mayor abundancia con un estimado de  $0.5 \log_{10}$ , por encima del detectado en el sector la FAE en el agua y sedimento del río,

posiblemente debido a la acumulación de contaminación a lo largo de la cuenca. El gen *tetW* presentó una abundancia relativa de 0.95 log<sub>10</sub> en el agua del río Patate y 1.47 log<sub>10</sub> en el sedimento del mismo. Los genes *sull* y *bla*<sub>TEM</sub> presentaron una abundancia de alrededor de 0.6 log<sub>10</sub> en el agua del río, y alrededor de 0.7-0.9 log<sub>10</sub> en el sedimento, lo que indica nuevamente que los sedimentos son importantes reservorios de ARGs, los cuales varían según el nivel antropogénico circundante.

El agua de los ríos de la provincia de Pichincha, presentó una mayor contaminación con ARGs que el agua de los ríos de las provincias analizadas; por ejemplo, el río Machángara y el río Pita (sector Tumbaco), presentaron una abundancia relativa total de ARGs superior a los 6 log<sub>10</sub>/mL. Estos niveles de ARGs son similares a los detectados en aguas residuales en otras partes del mundo (**Colomer-Lluch, Calero-Cáceres, et al., 2014b; Czekalski et al., 2012; Quach-Cu et al., 2018; Xu et al., 2015**). Motivo por el cual, sus aguas pueden representar un peligro sanitario y ambiental significativo ya que no reciben tratamiento. El río Pita nace de los deshielos del Sincholagua y del volcán Cotopaxi, sin embargo aguas abajo se convierte en el receptor de aguas residuales de los sectores del Valle de los Chillos, la cual tiene un aporte de desechos tóxicos a lo largo de su cuenca (**Freile & Fabara, 2009**). En el agua del río, se halló en mayor abundancia el gen *bla*<sub>TEM</sub>, con un valor de 1.8 log<sub>10</sub>, en relación a los genes *sull* y *qnrS* con una abundancia relativa de 1.2log<sub>10</sub>, en el sedimento del río Pita se halló el gen *tetW* con una abundancia de 1.26 log<sub>10</sub>, el cual no se encontró en el agua del río, posiblemente esto ocurrió debido a una dilución del contaminante a través del crecido caudal (**Calero-Cáceres et al., 2017**).

En el agua del río Machángara, se cuantificó en mayor abundancia los genes *ermB* y *tetW*, con una abundancia relativa alrededor de 1.8 log<sub>10</sub> y en el sedimento con una abundancia de 1.76 log<sub>10</sub>. Alrededor de este río existe la presencia de actividades agrícolas y una elevada densidad poblacional que puede influenciar la concentración de contaminantes; los genes *qnrS* y *bla*<sub>TEM</sub> presentaron una abundancia alrededor de 0.8 log<sub>10</sub> en el agua y en el sedimento del río alrededor de 1.2 log<sub>10</sub>. Cerca del río se

encuentran industrias, además de aguas de origen urbano procedentes de ciudad de Quito (Campañá et al., 2017).

El río Guachalá, en el sector Cayambe en la provincia de Pichincha, presentó una abundancia relativa de ARGs total menor que el río Pita y Machángara. En este punto se detectó una abundancia total de  $4 \log_{10}$ , presentándose en mayor abundancia el gen *ermB* con  $1 \log_{10}$  y el gen *tetW* con  $0,73 \log_{10}$ , mientras que los genes *sull*, *qnrS* y *bla<sub>TEM</sub>*, presentaron una abundancia relativa alrededor de  $0,4 \log_{10}$ . En este punto, las abundancias del sedimento para mencionados ARGs fueron mayores, de **0.5** a  $1 \log_{10}$ , por encima del detectado en el agua del río. Esta agua alimenta al río Pisque, el cual se usa como sistema de riego de varios cantones de la provincia de Pichincha hasta llegar al sector Yaruquí y finalmente al sector Pifo. El canal Yaruquí fue el segundo canal con mayores niveles de ARGs en este estudio. Los dos canales presentan a su alrededor cultivos, ganado y carecen de revestimiento de hormigón, por lo que el agua arrastra consigo sedimentos, los cuales son también considerados como reservorios de ARGs (Calero-Cáceres et al., 2017; B. Chen et al., 2013; Marti, Jofre, & Balcazar, 2013). En el agua del canal del sector Yaruquí, la abundancia relativa total fue de  $7.3 \log_{10}$ , en el cual se presentó en mayor abundancia el gen *bla<sub>TEM</sub>* con  $2,5 \log_{10}$ , mientras que *sull*, *qnrS* y *ermB* obtuvieron un valor alrededor de  $0.8 \log_{10}$  y alrededor de  $1.6 \log_{10}$  para *ermB* y *tetW* en el sedimento del canal. El agua del canal del sector Pifo, presentó una abundancia relativa total de  $4.8 \log_{10}$  siendo esta menor a la del sector Yaruquí, en el cual el gen que mayor abundancia obtuvo fue *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* con un valor de  $0.9 \log_{10}$ , en relación a los genes *ermB* y *tetW* que obtuvieron una abundancia relativa de  $0.7 \log_{10}$ , abundancias que se presentaron en mayor concentración en el sedimento del canal Pifo, sobresaliendo los genes *sull*, *tetW* y *ermB* con una valor alrededor de  $1.4 \log_{10}$ . Las abundancias fueron bajas en relación a las obtenidas en otras locaciones alrededor del mundo, impactadas por actividades humanas ( $1 \log_{10}$ - $9 \log_{10}$ ), (B. Chen et al., 2013; Y. Luo et al., 2010; Sabri et al., 2018; Zhou et al., 2013; Zhu et al., 2013).

Los ríos de la provincia del Guayas ocuparon el tercer puesto en mayor contaminación por ARGs, extendiéndose la abundancia relativa desde los  $3.8 \log_{10}$

hasta los 4.5 log<sub>10</sub>. Presentaron además una abundancia relativa del gen *intI* similar alrededor de 1.5 log<sub>10</sub>. En el río Daule, según un estudio realizado por la **Universidad Agraria del Ecuador, 2009**, detectaron niveles elevados de coliformes fecales debido al descarte de aguas residuales. En este estudio se detectaron los genes *sull*, *bla*<sub>TEM</sub>, *tetW* y *ermB*, con una abundancia relativa alrededor de 0.9 log<sub>10</sub>, se cuantificó además una mayor abundancia relativa de los genes *sull* y *qnrS* en los sedimentos del río en comparación al agua (Figura 8), con valores de 0.87 log<sub>10</sub> y 1.2 log<sub>10</sub> respectivamente. Esto podría deberse a que los ácidos húmicos presentes en el suelo, los cuales son capaces de retener contaminantes químicos y biológicos en las partículas de suelo (**Gu & Karthikeyan, 2008; Nagler et al., 2018**). Estos hallazgos representan un riesgo potencial, debido a la elevada dependencia que tienen los pobladores aledaños con el río en mención.

En el agua del río Daule, del sector Santa Lucía (Figura 6), los genes con mayor abundancia fueron *sull* y *bla*<sub>TEM</sub>, ( $\approx 1.2$  log<sub>10</sub>); mientras que el gen *qnrS* obtuvo un valor de 0.76 log<sub>10</sub>. El agua del Sector Santa Lucía se distribuye a través de ramales que forman canales para abastecer a toda la localidad. En las aguas de los ramales 1 y 3, el gen que mayor abundancia relativa presentó fue *bla*<sub>TEM</sub> con un valor alrededor de 1.4 log<sub>10</sub>, mientras que en los sedimentos de estos ramales el gen con mayor abundancia fue *sull* con un valor de 0.68 log<sub>10</sub>. El gen *ermB* se cuantificó en mayor abundancia en el ramal 2 con un valor de 1.1 log<sub>10</sub> y 1.61 log<sub>10</sub> en el sedimento. Estos valores son moderados en relación a los cuantificados en un estudio realizado en el agua del río Funan-China (5-6 log<sub>10</sub>), (**Tuo et al., 2018**). Alrededor de estos ramales se desarrollan actividades agropecuarias, especialmente ganaderas. Las aguas del río Daule atraviesan la localidad de Santa Lucía, que posteriormente pasan por el sector de Nobol a través de canales de riego (Figura 5), en el cual se halló el gen *sull* con una abundancia de 0.93 log<sub>10</sub>. En el caso del sedimento de este sector (Figura 7), *sull* se presentó en menor concentración con un valor de 0.73 log<sub>10</sub>, a pesar de presentar el sedimento una mayor población bacteriana según la cuantificación del gen 16S rDNA (Anexo A.). Un estudio afirma que las distintas concentraciones de ARGs en los distintos medios ambientales pueden variar según el impacto antropogénico recibido (Lapara et al., 2011). En este punto, el gen *sull* en el

agua se presentó en mayor abundancia que en los sedimentos. Este efecto puede deberse a las características fisicoquímicas de los sedimentos, como por ejemplo el tipo y tamaño de partícula (X. Luo et al., 2019). Las abundancias relativas detectadas en el canal de riego punto de captación Naranjito presentó una densidad menor a los de Santa Lucía, sin embargo presentó diferente diversidad al encontrarse la presencia del gen *tetW* y ausencia del gen *qnrS*. Cada una de estos cuerpos de agua puede presentar diversos contribuyentes de contaminación, motivo por el cual es necesario realizar estudios de identificación de la contaminación fecal específicos o *Microbial source tracking* con la finalidad de detectar si esta contaminación tiene un origen animal o humano.

En el agua del río Milagro (Figura 6), se encontró los genes *sull*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW* y *ermB* con valores entre 0.5-1 log<sub>10</sub>, mientras que en el sedimento del río (Figura 8), se halló los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* con un valor de 0.6 log<sub>10</sub>. El río Milagro distribuye el agua al cantón Carrizal de Milagro y al sector de Naranjito a través de canales de riego. En el agua del canal del cantón Carrizal (Figura 5), además de los genes hallados en el agua del río Milagro como *sull*, *bla<sub>TEM</sub>* y *ermB* se encontró el gen *qnrS* con una abundancia de 1.14 log<sub>10</sub>, gen más abundante en relación al cuantificado en el agua de canales de riego de las provincias restantes de (0-9 log<sub>10</sub>), mientras que en el sedimento del canal (Figura 7) se halló el gen *sull*, con una abundancia alrededor de 0.93 log<sub>10</sub> el cual fue mayor a la abundancia obtenida de aguas del río (0.89 log<sub>10</sub>).

En el sector Naranjito, en el agua del canal de riego (Figura 5), el gen con mayor abundancia fue *sull* con una abundancia relativa de 0.73 log<sub>10</sub>, el cual fue mayor en el sedimento, mientras que en el sedimento del canal (Figura 7), los genes con mayor abundancia fueron *tetW* y *ermB*, los cuales se presentaron en menor abundancia en el agua del canal de riego con un valor alrededor de 0.55 log<sub>10</sub>. En un estudio realizado por B. Chen et al., 2013, informó que los genes *tetW* y *ermB* están fuertemente influenciados por actividades humanas, lo que indica que los suelos y el agua de



riego de Naranjito presentan un potencial impacto de actividades humanas las que han actuado en detrimento de su calidad.

El agua del río Portoviejo-Manabí (Figura 6), aguas arriba presentó menor contaminación con ARGs en relación al resto de provincias; en el cual se presentó la presencia del ARG *sull*, con una abundancia relativa de  $0.65 \log_{10}$  y  $0.69 \log_{10}$  en el caso del sedimento del río (Figura 8). La presencia del gen *sull* indica que el agua posiblemente podría estar contaminada con residuos biológicos, los cuales son arrastrados por la lluvia desde el suelo hacia el agua (Y. Luo et al., 2010). Sin embargo, su diseminación mundial es tal que se encuentra presente en aguas con bajo nivel de influencia antropogénica (D'Costa et al., 2011). El primer canal de riego del río Portoviejo fue el más contaminado de la provincia de Manabí, en donde los genes con mayor abundancia relativa fueron *sull*, *bla<sub>TEM</sub>* y *ermB* con un valor alrededor de  $1,2 \log_{10}$ , mientras que en el sedimento del canal mencionados genes se cuantificaron con una mayor abundancia, alrededor de  $1-2 \log_{10}$ . El gen de resistencia a eritromicina *ermB* fue el más abundante en el sedimento, con un valor de  $2 \log_{10}$ . Considerando la abundancia detectada, es necesario realizar una investigación detallada sobre el origen de esta contaminación en este canal de riego, el cual presenta densidades similares a las de aguas residuales y lodos de depuradora urbanos (Bouki, Venieri, & Diamadopoulos, 2013; Calero-Cáceres et al., 2014).

El gen *int1* se cuantificó en todas las muestras (aguas y sedimentos), con abundancias relativas comprendidas entre  $0.6-2 \log_{10}$ , las concentraciones variaron significativamente según la ubicación de la muestra y el impacto antropogénico circundante. Los microorganismos que porten este gen, podrían responder a un estrés generado por distintos agentes antimicrobianos, acción que facilita los procesos de transferencia horizontal génica (Barraud, Casellas, Dagot, & Ploy, 2013; Ndi & Barton, 2011; Partridge et al., 2009). La presencia del gen *int1* en este estudio posiblemente se deba a que este también responde a una presión ejercida en el medio ambiente por agentes antimicrobianos y metales pesados de igual manera que los ARGs. Según un estudio realizado por B. Chen et al., 2015, en el río Perla en China,

se observó que a una mayor concentración de antibióticos en el agua del río, existió una mayor abundancia del gen *int1*; por lo que, en base a los resultados de este estudio, el agua del río Pita-Tumbaco, el agua del canal de riego Huachi-Pelileo-Ambato y del ramal del punto de captación del canal Naranjito, podrían contener una concentración de antibióticos y de estresores químicos notables, por presentar abundancias del gen *int1* mayores, sin embargo, en el canal de agua del ramal del punto de captación del canal Naranjito-Guayas (Figura 5), se observa que las abundancias de los genes restantes no son altas. Existen una gran cantidad de factores que pueden influenciar las densidades de estos contaminantes en cuerpos de agua y sedimentos, por lo que cuantificar la influencia de determinadas actividades humanas y ambientales sobre estas densidades es complicado. Sin embargo, este estudio pretendió analizar estos genes diana como indicadores de calidad general de cuerpos de agua. Es necesario realizar investigaciones complementarias con la finalidad de detectar de una manera más específica los orígenes de contaminación y minimizar el impacto antropogénico de las aguas superficiales.

❖ **Detección de la presencia de ARGs (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *mcr-1*, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>) por medio de PCR convencional (PCR) en muestras de aguas y sedimentos de canales de agua de riego y ríos**

En los ríos Daule y Machángara, se detectaron amplificaciones de los genes de resistencia productores de carbapenemasas *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>. La detección de microorganismos portadores de estos genes es considerado como de elevada importancia por la Organización Mundial de la Salud, ya que otorgan resistencia a la familia de los carbapenémicos, antibióticos considerados como último recurso frente a infecciones de microorganismos multirresistentes (Who, 2017a). Sorprendentemente, los puntos con mayor frecuencia de detección de genes de resistencia a carbapenémicos *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, betalactámicos *bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>SHV</sub> fue detectado en el ramal derivado del punto de captación Naranjito, y en el canal Ambato-Huachi-Pelileo (con excepción del gen *bla*<sub>CTX-M</sub>). Estos hallazgos representan un peligro potencial, ya que estos puntos adicionalmente poseen elevadas

densidades de genes de resistencia a otros grupos de antibióticos, así como del gen de integrasa 1. Estos puntos podrían representar un reservorio y un potencial reactor de genotipos de resistencia, y al estar ubicados en canales de agua de riego, pueden diseminarse fácilmente hacia cultivos y otras áreas geográficas. En el segundo y tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía-Guayas se detectó *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub> respectivamente. En el agua de los canales de riego de la provincia de Manabí, Cotopaxi y Pichincha no se detectó ningún gen mediante la técnica de PCR (convencional) a pesar de que presentan un nivel antropogénico alto.

Estudios realizados en diferentes partes del mundo han detectado la presencia de Enterobacterias y otra clase de bacterias Gram negativas en medios acuáticos contaminados con residuos biológicos y contaminantes industriales, con resistencia a carbapenems y betalactámicos (**Galler et al., 2014; Nordmann et al., 2012; Ovejero et al., 2017; Piedra-Carrasco et al., 2017; Poirel et al., 2011**). Estas bacterias pueden propagarse fácilmente a través de los alimentos hacia bacterias de la microbiota humana, pudiendo producirse episodios de transferencia genética horizontal y favorecer a la evolución de nuevos clones resistentes.

En sedimentos, la frecuencia de detección fue menor. En la provincia del Guayas, se detectó la presencia de *bla*<sub>CMY</sub> en el sedimento del ramal derivado del punto de captación Naranjito y *bla*<sub>OXA-48</sub> en el ramal derivado del punto de captación del Carrizal. En la provincia de Manabí y Cotopaxi, los sedimentos de canales de riego afectados con *bla*<sub>KPC</sub> fueron el canal de riego de Portoviejo-Manabí y el punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo- Cotopaxi. En los sedimentos de los ríos Ambato y Machángara fue detectado el gen *bla*<sub>KPC</sub>, con adición del gen *bla*<sub>OXA-48</sub>. La presencia de enterobacterias portadoras de carbapenemasas se ha incrementado a nivel mundial, siendo detectada en aislamientos clínicos del Ecuador con relativa frecuencia en los últimos años (**Satán & Tamayo, 2016**). Por lo que estos hallazgos representan un peligro potencial, ya que los cuerpos de agua pueden actuar como elementos de diseminación de genotipos de resistencia a antibióticos.

En los sedimentos provenientes de ríos de las provincias de: Manabí, Guayas y Cotopaxi no se detectó ningún gen evaluado. Adicionalmente, en ninguna muestra fue detectada la presencia del gen de resistencia móvil a colistina *mcr-1*, y de productores de carbapenemasas *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*; a pesar de que han sido detectados recientemente en aislamientos de origen clínico y veterinario en Ecuador (**D. Ortega-Paredes, Barba, & Zurita, 2016; Ortega-Paredes et al., 2019; Romero- Alvarez et al., 2017**).

Los microorganismos productores de carbapenemasas y resistentes a colistina son genes nosocomiales productos de la evolución microbiana y que en la actualidad presentan una diseminación mundial acelerada. Las infecciones causadas por estos organismos dejan pocas opciones de tratamiento a la población (**Tzouveleakis et al., 2012; Who, 2017b**). En Ecuador, el seguimiento epidemiológico de microorganismos resistentes y su evolución necesita ser considerado con una mayor prioridad, considerando las implicaciones sanitarias que posee y su posible impacto económico y social, ya que se estima que la sociedad mundial se enfrentará a un período post-antibiótico, en el cual los tratamientos comunes no serán efectivos frente a organismos multirresistentes (**Ventola, 2015**).

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 Conclusiones

- Se detectó y cuantificó mediante la técnica qPCR cinco ARGs, un gen de integrasa clase 1 y el gen 16S rDNA en muestras seleccionadas de aguas y sedimentos de ríos y canales de agua de riego del Ecuador, detectándose al menos un ARG en cada muestra. Los genes detectados con mayor frecuencia fueron: el gen de resistencia a sulfonamidas *sulI* y el gen de resistencia a betalactámicos *bla<sub>TEM</sub>*, en aguas y sedimentos. En todas las muestras, se detectó el gen *int1*. Las muestras que presentaron mayor abundancia relativa de estos contaminantes fueron: canal derivado del punto de captación Naranjito (agua), el canal Portoviejo-Manabí (sedimento), el agua del río Pita y en el sedimento del río Machángara.
- Se detectó mediante la técnica de PCR convencional la presencia de genes con resistencia a carbapenémicos *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CMY</sub>* y a betalactámicos *bla<sub>CTX-M</sub>* y *bla<sub>SHV</sub>* en las muestras de los puntos: ramal derivado del punto de captación Naranjito, canal Ambato-Huachi-Pelileo (con excepción del gen *bla<sub>CTX-M</sub>*) y en los ríos Daule y Machángara (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>CMY</sub>*). Estos puntos además poseen elevadas densidades de otros ARGs, cuantificados por qPCR.
- Las frecuencias de detección de ARGs en cuerpos de aguas y sedimentos se incrementaron en los sectores con mayor urbanización; demostrándose este efecto en la mayoría de puntos de muestreo. Es de especial relevancia los observados en el río Cutuchi, ramales del canal Latacunga-Salcedo-Ambato, canal Ambato-Huachi-Pelileo, canal del río Portoviejo, río Pita y río Machángara.

- Los sedimentos contienen densidades elevadas de ARGs, por lo cual pueden actuar como un reservorio de estos contaminantes. Diferentes episodios climáticos como lluvias torrenciales y deslaves podrían movilizar estos contaminantes a los cuerpos de agua e impactar negativamente a los ecosistemas receptores.
- Se evidenció el elevado nivel de contaminación antropogénica en los ríos y canales de agua de riego del país, ocasionado por los bajos niveles de cobertura de sistemas de tratamiento de aguas residuales. Es necesaria la realización de investigaciones complementarias para evidenciar detalladamente los orígenes de esta contaminación y evitar su diseminación ambiental.

## **4.2 Recomendaciones**

En base a los resultados obtenidos en este estudio se recomienda:

- Implementar plantas de tratamiento de aguas residuales en Ecuador.
- Considerar diferentes indicadores de contaminación biológica emergente en los cuerpos de agua, con la finalidad de mejorar la calidad ambiental, la seguridad sanitaria y alimentaria de las zonas de influencia.
- Realizar un estudio sobre la influencia de la contaminación industrial en la abundancia de ARGs en medios acuáticos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allué, A., García, C., & Muniesa, M. (2011). Bacteriophage-encoding cytolethal distending toxin type V gene induced from nonclinical *Escherichia coli* isolates. *Infection and Immunity*, 79(8), 3262–3272. <https://doi.org/10.1128/IAI.05071-11>
- Aminov, R. I., & Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2011, September). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*. Narnia. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>
- Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., & Ploy, M. C. (2013). An antibiotic-resistant class 3 integron in an enterobacter cloacae isolate from hospital effluent. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(7), 3–5. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12186>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Martínez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Berglund, B., Fick, J., & Lindgren, P. E. (2015). Urban wastewater effluent increases antibiotic resistance gene concentrations in a receiving northern European river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/etc.2784>
- Berglund, B., Khan, G. A., Lindberg, R., Fick, J., & Lindgren, P. E. (2014). Abundance and dynamics of antibiotic resistance genes and integrons in lake sediment microcosms. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108151>
- Bouki, C., Venieri, D., & Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety, 91, 1–9.

Boxall, A. (2012). *New and Emerging Water Pollutants arising from agriculture*.

*New and emerging water pollutants arising from agriculture*. York.

Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/es501851s>

Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*, 223, 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>

Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>

Campaña, A., Gualoto, E., & Chiluisa-Utreras, V. (2017). Evaluación físico-química y microbiológica de la calidad del agua de los ríos Machángara y Monjas de la red hídrica del distrito metropolitano de Quito. *Bionatura*, 2(2), 305–310. <https://doi.org/10.21931/rb/2017.02.02.6>

Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>

Chen, B., Liang, X., Huang, X., Zhang, T., & Li, X. (2013). Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators. *Water Research*, 47(8), 2811–2820. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.042>

Chen, B., Liang, X., Nie, X., Huang, X., Zou, S., & Li, X. (2015). The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China. *Journal of Hazardous Materials*, 282, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.010>

Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of erm Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems, Chen, J., Yu, Z., Michel,



- F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of *erm* Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014a). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, 73, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE*, 6(3), e17549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1265–1274. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt528>
- Cytryn, E. (2013). The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>
- Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology*, 3, 106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>
- Czekalski, N., Gascón Díez, E., & Bürgmann, H. (2014). Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *The ISME Journal*, 1381–1390. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.8>
- Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., & Bürgmann, H. (2015). Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environment International*, 81, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>

- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Di Cesare, A., Eckert, E. M., D'Urso, S., Bertoni, R., Gillan, D. C., Wattiez, R., & Corno, G. (2016). Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 94, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>
- Diario el telégrafo. (2015). Unamuncho coexiste con un canal de riego contaminado. Retrieved from <https://www.letelegrafo.com.ec/noticias/nuestros/1/unamuncho-coexiste-con-un-canal-de-riego-contaminado>
- Diario La Hora. (2016). Ecuador: el 88% de las aguas residuales llegan a los ríos. Retrieved from [https://lahora.com.ec/noticia/1101997377/ecuador-88\\_-de-las-aguas-residuales-llega-a-los-ros-](https://lahora.com.ec/noticia/1101997377/ecuador-88_-de-las-aguas-residuales-llega-a-los-ros-)
- Diario La Hora. (2018). Altos niveles de contaminacion en el rio Ambato. Retrieved from <https://lahora.com.ec/tungurahua/noticia/1102151575/altos-niveles-de-contaminacion-en-el-rio-ambato->
- Dierikx, C. M., van Duijkeren, E., Schoormans, A. H. W., van Essen-Zandbergen, A., veldman, K., Kant, A., Mevius, D. J. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(6), 1368–1374. <https://doi.org/10.1093/jac/dks049>
- Dillon, J. A. R., & Yeung, K. H. (1989).  $\beta$ -Lactamase plasmids and chromosomally mediated antibiotic resistance in pathogenic *Neisseria* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(SUPPL.).
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>
- Fahrenfeld, N., Ma, Y., O'Brien, M., & Pruden, A. (2013). Reclaimed water as a reservoir of antibiotic resistance genes: Distribution system and irrigation

- implications. *Frontiers in Microbiology*, 4(May), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>
- Freile, J., & Fabara, J. (2009). La sublime y trágica historia del valle del Pita. Ecuador terra incognita. Una mirada diferente al Ecuador. N°58. Retrieved from [http://www.terraecuador.net/revista\\_58/58\\_pita.html](http://www.terraecuador.net/revista_58/58_pita.html)
- Galler, H., Feierl, G., Peternel, C., Reinthaler, F. F., Haas, D., Grisold, A. J., Zarfel, G. (2014). KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(2). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12336>
- Gobierno Provincial de Tungurahua. (2014). Plan provincial de riego Tungurahua 2014-2029, 273.
- Gu, C., & Karthikeyan, K. G. (2008). Sorption of the antibiotic tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*, 37(2), 704–711. <https://doi.org/10.2134/jeq2007.0030>
- Heider, L. C., Hoet, A. E., Wittum, T. E., Khaita, M. L., Love, B. C., Huston, C. L., Gebreyes, W. A. (2009). Genetic and phenotypic characterization of the blaCMY gene from escherichia coli and salmonella enterica isolated from food-producing animals, humans, the environment, and retail meat. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1235–1240. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0294>
- Karkman, A., Do, T. T., Walsh, F., & Virta, M. P. J. (2018). Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology*, 26(3), 220–228. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2017.09.005>
- Lachmayr, K. L., Cavanaugh, C. M., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific tem  $\beta$ -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203–211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
- Lapara, T. M., Burch, T. R., McNamara, P. J., Tan, D. T., Yan, M., & Eichmiller, J. J. (2011). Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance genes into Duluth-Superior Harbor. *Environmental Science and Technology*, 45(22), 9543–9549. <https://doi.org/10.1021/es202775r>
- Lekunberri, I., Villagrasa, M., Balcázar, J. L., & Borrego, C. M. (2017). Contribution of bacteriophage and plasmid DNA to the mobilization of antibiotic resistance

- genes in a river receiving treated wastewater discharges. *Science of The Total Environment*, 601–602, 206–209. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.05.174>
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>
- Ling, Z., Yang, Y., Huang, Y., Zou, S., & Luan, T. (2013). A preliminary investigation on the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the Beijiang River, South China. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 25(8), 1656–1661. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60223-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60223-X)
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Luo, X., Xiang, X., Huang, G., Song, X., Wang, P., & Fu, K. (2019). Bacterial abundance and physicochemical characteristics of water and sediment associated with hydroelectric dam on the Lancang River, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph16112031>
- Luo, Y., Mao, D., Rysz, M., Zhou, Q., Zhang, H., Xu, L., & Alvarez, P. J. J. (2010). Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science and Technology*, 44(19), 7220–7225. <https://doi.org/10.1021/es100233w>
- Lupo, A., Coyne, S., & Berendonk, T. U. (2012). Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3, 18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
- Marti, E., Jofre, J., & Balcazar, J. L. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in a river influenced by a wastewater treatment plant. *PloS One*, 8(10), e78906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078906>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcázar, J. L. (2014a). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the

- environment. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(7), O456-9. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12446>
- Marti, E., Variatza, E., & Balcázar, J. L. (2014b). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in Microbiology*, 22(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- Nagler, M., Insam, H., Pietramellara, G., & Ascher-Jenull, J. (2018). Extracellular DNA in natural environments: features, relevance and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(15), 6343–6356. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9120-4>
- Ndi, O. L., & Barton, M. D. (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 34(8), 589–599. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2011.01272.x>
- Negreanu, Y., Pasternak, Z., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2012). Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils. *Environmental Science and Technology*, 46(9), 4800–4808. <https://doi.org/10.1021/es204665b>
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- O'Neill, J. (2015). Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance, (December).
- Ortega-Paredes, D., Barba, P., & Zurita, J. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador. *Epidemiology and Infection*, (2016), 1–4. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001369>
- Ortega-Paredes, D., Haro, M., Leoro-Garzón, P., Barba, P., Loaiza, K., Mora, F., Fernández-Moreira, E. (2019). Multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated

- from canine feces in a public park in Quito, Ecuador. *Journal of global antimicrobial resistance*. <https://doi.org/10.1016/J.JGAR.2019.04.002>
- Ovejero, C. M., Delgado-Blas, J. F., Calero-Caceres, W., Muniesa, M., & Gonzalez-Zorn, B. (2017). Spread of mcr-1-carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4), 1050–1053. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw533>
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons: Review article. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>
- Pei, R., Kim, S. C., Carlson, K. H., & Pruden, A. (2006). Effect of river Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 40(12), 2427–2435. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>
- Piedra-Carrasco, N., Fàbrega, A., Calero-Cáceres, W., Cornejo-Sánchez, T., Brown-Jaque, M., Mir-Cros, A., González-López, J. J. (2017). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. *PLoS ONE*, 12(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175246>
- Poirel, L., Barbosa-Vasconcelos, A., Simões, R. R., Da Costa, P. M., Liu, W., & Nordmann, P. (2012). Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1662–1663. <https://doi.org/10.1128/AAC.05850-11>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Proia, L., Anzil, A., Subirats, J., Borrego, C., Farrè, M., Llorca, M., Servais, P. (2018). Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. *Science of the Total Environment*, 628–629, 453–466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.083>
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H., & Carlson, K. H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado. *Environmental Science and Technology*, 40(23), 7445–7450. <https://doi.org/10.1021/es060413l>

- Quach-Cu, J., Herrera-Lynch, B., Marciniak, C., Adams, S., Simmerman, A., & Reinke, R. A. (2018). The effect of primary, secondary, and tertiary wastewater treatment processes on antibiotic resistance gene (ARG) concentrations in solid and dissolved wastewater fractions. *Water (Switzerland)*, 10(1), 13–18. <https://doi.org/10.3390/w10010037>
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Martí, E., Huerta, B., Gros, M., Sánchez-Melsió, A., Balcázar, J. L. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, 69, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Romero-Alvarez, D., Reyes, J., Quezada, V., Satán, C., Cevallos, N., Barrera, S., Villacís, J. E. (2017). First case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Ecuador: an update for South America. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.10.012>
- Rosewarne, C. P., Pettigrove, V., Stokes, H. W., & Parsons, Y. M. (2010). Class 1 integrons in benthic bacterial communities: Abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00823.x>
- Sabri, N. A., Schmitt, H., Van der Zaan, B., Gerritsen, H. W., Zuidema, T., Rijnaarts, H. H. M., & Langenhoff, A. A. M. (2018). Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>
- Sánchez, A. (2014). AGUAS RESIDUALES: Realidad y Perspectivas. Secretaría Nacional Del Agua. Retrieved from [https://es.slideshare.net/CCIFEC/20-gestin-de-aguas-residuales-en-ecuador-senagua?from\\_action=save](https://es.slideshare.net/CCIFEC/20-gestin-de-aguas-residuales-en-ecuador-senagua?from_action=save)
- Satán, C., & Tamayo, R. (2016). Epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen blaKPC, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Stange, C., Yin, D., Xu, T., Guo, X., Schäfer, C., & Tiehm, A. (2019). Distribution

- of clinically relevant antibiotic resistance genes in Lake Tai, China. *Science of the Total Environment*, 655, 337–346. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.211>
- Stoll, C., Sidhu, J. P. S., Tiehm, A., & Toze, S. (2012). Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia. *Environmental Science and Technology*, 46(17), 9716–9726. <https://doi.org/10.1021/es302020s>
- Subsecretaría de Riego y Drenaje. (2011). 2011 - 2026 Plan nacional de riego y drenaje. Subsecretaria de Riego y Drenaje.
- Tuo, H., Yang, Y., Tao, X., Liu, D., Li, Y., Xie, X., Zhang, A. (2018). The Prevalence of Colistin Resistant Strains and Antibiotic Resistance Gene Profiles in Funan River, China. *Frontiers in Microbiology*, 9(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03094>
- Tzouveleakis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: An evolving crisis of global dimensions. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 682–707. <https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>
- Universidad agraria del Ecuador. (2009). Proyecto Biomonitorio de la calidad del agua para determinar la naturaleza y grado de la contaminación por la agricultura y actividades afines en los principales ríos en la cuenca del río Guayas.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), 277–283.
- Walsh, F., Ingenfeld, A., Zampiccoli, M., Hilber-Bodmer, M., Frey, J. E., & Duffy, B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.011>
- Who. (2017a). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://doi.org/10.1590/S0100-15742013000100018>
- Who. (2017b). Who updates Essential Medicines List with new advice on use of antibiotics, and adds medicines for hepatitis C, HIV, tuberculosis and cancer.



- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1670). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
- Wright, M. S., Baker-Austin, C., Lindell, A. H., Stepanauskas, R., Stokes, H. W., & McArthur, J. V. (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: Class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME Journal*, 2(4), 417–428. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8>
- Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Zhang, Y., & Zeng, Z. (2014). Antibiotic resistance genes occurrence and bacterial community composition in the Liuxi River. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 61. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00061>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>
- Yang, Y., Zhang, T., Zhang, X. X., Liang, D. W., Zhang, M., Gao, D. W., Fang, H. H. P. (2012). Quantification and characterization of  $\beta$ -lactam resistance genes in 15 sewage treatment plants from East Asia and North America. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1351–1358. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3810-5>
- Zhang, X.-X., Zhang, T., & Fang, H. H. P. (2009). Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), 397–414. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(1), 79–101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhang, R. Q., Lai, H. J., Chen, Z. F., & Pan, C. G. (2013). Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. *Science of the Total Environment*, 444, 183–195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.087>
- Zhu, Y. G., Johnson, T. A., Su, J. Q., Qiao, M., Guo, G. X., Stedtfeld, R. D., Tiedje,

J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3435–3440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>

## **ANEXOS**

## ANEXO A

**DATOS OBTENIDOS EN LA CUANTIFICACIÓN DE ARGs (*sulI*, *qnrS*, *bla<sub>TEM</sub>*, *tetW*, *ermB*) Y DE LOS GENES 16S rDNA e *int1* EN MUESTRAS DE AGUAS Y SEDIMENTOS DE 5 PROVINCIAS DEL ECUADOR (MANABÍ, GUAYAS, PICHINCHA, COTOPAXI Y TUNGURAHUA), MEDIANTE LA TÉCNICA DE qPCR.**

**Tabla 12.** Cuantificación de ARGs (Log<sub>10</sub> GC/mL) en muestras de aguas provenientes de canales de riego y de ríos

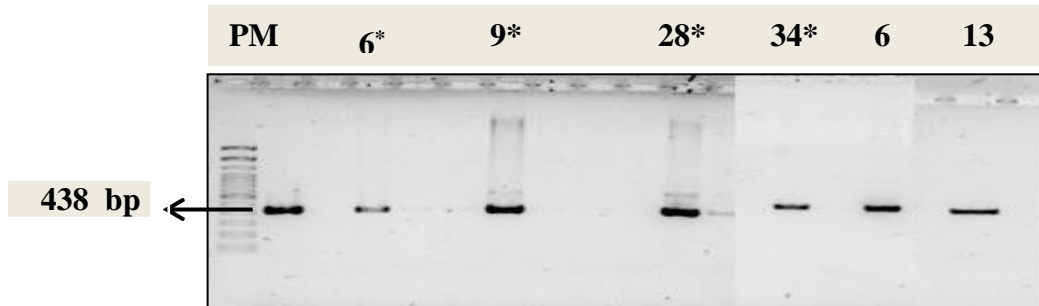
Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	16S	su1I	qnrS	bla <sub>TEM</sub>	tet W	ermB	int1
Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo- Manabí	10/09/2018	4.23	4.73	3.11	5.16	3.37	4.91	7.23
Ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	3.87	3.59	3.33	6.07	-	2.91	5.61
Río Ambato	Ambato- Tungurahua	24/10/2018	5.13	4.59	3.59	2.78	3.81	5.59	6.65
Río Milagro	Milagro- Guayas	03/10/2018	3.04	3.06	-	2.02	2.45	2.74	4.86
Ramal derivado del punto de captación Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	2.30	2.60	-	5.75	-	3.38	3.97
Río Machángara	Quito- Pichincha	13/08/2018	6.11	-	4.42	5.54	5.84	7.65	7.98
Ramal derivado de la local Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	3.66	4.00	2.32	6.94	-	4.05	5.30
Río Daule	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	4.13	4.36	3.16	5.27	-	-	6.22
Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	3.43	2.53	-	1.84	2.19	2.35	8.46
Ramal derivado del punto de captación del río Daule	Daule- Guayas	02/10/2018	5.31	3.01	2.77	6.69	-	-	4.89
Río Paute	Paute- Guayas	02/10/2018	3.62	3.22	2.68	-	-	3.04	5.52
Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	6.58	4.30	2.37	5.46	2.75	-	5.91
Ramal derivado del punto de captación del Carrizal del río Guayas	Guayaquil-Guayas	10/09/2018	3.01	2.70	3.46	3.47	-	-	4.53
Ramal derivado del punto de captación del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	2.19	1.96	2.35	3.36	-	-	3.85
Punto de captación del canal de Latacunga-Río Cutuchi	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	3.92	3.38	2.93	4.02	3.49	-	5.81
Punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	7.33	3.38	2.42	2.92	-	2.60	5.80
Punto de captación del canal Ambato- Huachi- Pelileo sector Terremoto	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	4.23	3.00	2.09	2.95	-	-	5.06
Desague del canal Latacunga- Salcedo Ambato	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	4.85	3.90	2.25	2.97	-	-	5.69
Punto de captación del canal del río Guachal -Pifo	Quito- Pichincha	06/08/2018	3.02	2.93	-	2.76	2.99	3.11	4.77
Punto de captación del canal del río Patate	Patate- Tungurahua	03/09/2018	3.22	3.77	2.78	2.75	-	-	4.40
Tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	5.61	-	2.55	8.30	-	-	6.77
Segundo ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	4.25	3.45	-	2.96	-	-	5.01
Río Pita- Tumbaco	Quito - Pichincha	13/08/2018	1.88	1.97	2.36	3.42	-	-	4.00
Punto de captación del río Tosagua	Tosagua- Manabí	10/09/2018	4.64	3.26	-	3.36	-	-	5.04
Segundo canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	4.01	3.72	-	2.51	4.00	5.01	5.72
Punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo	Salcedo- Cotopaxi	20/08/2018	4.64	4.38	4.15	5.96	4.60	3.34	6.60
Segundo ramal derivado del punto de captación del Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	4.26	3.25	-	3.11	-	-	5.12
Ramal derivado del punto de captación del Canal Ambato- Huachi Pelileo – Río Ambato	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	4.18	6.40	2.41	6.12	5.44	6.89	9.05
Segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	5.38	4.93	-	3.43	3.87	4.98	7.37
Río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	5.20	3.39	-	-	-	-	5.85
Punto de captación del canal del río Guachalá - Yaruqui	Quito- Pichincha	06/08/2018	2.84	2.71	2.31	7.35	-	4.15	5.68
Río Cutuchi- Latacunga sector la FAE	Cotopaxi - Latacunga	20/08/2018	7.27	5.38	2.36	3.00	4.02	5.30	4.69
Segundo ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	5.22	3.71	2.70	-	-	3.32	5.71
Río Daule	Daule - Guayas	02/10/2018	6.73	5.94	-	5.26	3.86	3.08	8.30
Punto de captación del canal del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	4.41	2.94	-	2.07	-	-	4.74
Canal de riego del sector Mundug	Patate - Tungurahua	03/09/2018	3.82	-	2.38	-	-	-	2.52
Río Guachalá- Cayambe	Cayambe - Pichincha	06/08/2018	6.00	2.94	1.99	1.83	3.09	4.44	6.69
Primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	3.78	3.29	2.27	3.92	2.87	-	5.65
Río Cutuchi- Patate	Patate - Tungurahua	03/09/2018	6.96	4.57	-	3.55	4.05	5.90	6.67
Punto de captación del canal del río Daule	Nobol - Guayas	02/10/2018	2.42	2.25	-	-	-	-	4.32

**Tabla 13.** Cuantificación de ARGs (Log<sub>10</sub> GC/g) en muestras de sedimentos provenientes de canales de riego y de ríos

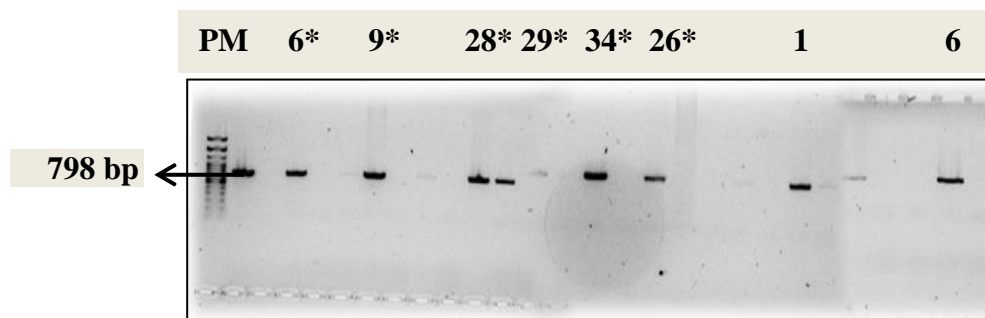
Nombre de la Localidad	Cantón-Provincia	Fecha	16S	<i>sulI</i>	<i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>tet W</i>	<i>ermB</i>	<i>intI</i>
Canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo- Manabí	10/09/2018	6.14	8.92	5.08	6.63	7.28	8.46	10.57
Ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	4.48	6.58	-	5.16	-	-	8.56
Río Ambato	Ambato- Tungurahua	24/10/2018	9.48	8.85	4.89	6.69	8.02	8.03	9.72
Río Milagro	Milagro- Guayas	03/10/2018	8.68	5.22	-	5.35	-	-	7.10
Ramal derivado del punto de captación Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	6.28	4.34	-	-	-	-	8.16
Río Machángara	Quito- Pichincha	13/08/2018	6.48	9.01	7.82	7.19	7.44	-	10.73
Ramal derivado de la local Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	6.53	5.91	5.60	-	-	-	6.12
Río Daule	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	6.72	5.82	4.92	5.73	-	-	7.57
Ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	8.51	7.40	-	5.49	5.65	6.01	9.12
Ramal derivado del punto de captación del río Daule	Daule- Guayas	02/10/2018	6.62	5.97	-	-	-	-	7.18
Río Paula	Paute- Guayas	02/10/2018	5.17	5.89	-	6.01	-	-	7.57
Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	7.95	5.11	-	-	-	-	6.41
Ramal derivado del punto de captación del carrizal del río Guayas	Guayaquil-Guayas	10/09/2018	8.69	8.12	-	7.15	-	-	10.18
Ramal derivado del punto de captación del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	7.23	4.69	-	-	-	-	6.58
Punto de captación del canal de Latacunga-río Cutuchi	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	8.89	8.30	-	5.72	7.76	8.76	9.80
Punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	9.71	6.68	-	-	5.46	-	7.43
Punto de captación del canal Ambato- Huachi- Pelileo sector Terremoto	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	9.75	6.84	-	-	6.37	7.09	8.62
Desague del canal Latacunga- Salcedo Ambato	Latacunga- Cotopaxi	20/08/2018	7.07	6.84	-	-	-	-	7.83
Punto de captación del canal del río Guachalá -Pifo	Quito- Pichincha	06/08/2018	4.06	5.78	-	-	5.34	5.10	6.85
Punto de captación del canal del Río Patate	Patate- Tungurahua	03/09/2018	7.22	7.07	-	-	-	-	7.99
Tercer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	7.90	5.40	-	-	-	-	5.98
Segundo Ramal derivado del punto de captación del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	7.90	5.35	-	-	-	-	6.57
Río Pita- Tumbaco	Quito - Pichincha	13/08/2018	8.30	6.48	-	-	5.36	-	8.26
Punto de captación del río Tosagua	Tosagua- Manabí	10/09/2018	9.26	6.47	-	-	-	-	6.65
Segundo canal de riego del río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	10/09/2018	8.25	6.15	4.80	-	-	-	7.18
Punto de captación del canal San Andrés de Pitaló-Salcedo	Salcedo- Cotopaxi	20/08/2018	8.26	8.52	4.66	6.64	8.26	8.29	13.17
Segundo ramal derivado del punto de captación del Carrizal	Tosagua- Manabí	10/09/2018	7.83	7.90	-	-	-	-	8.47
Ramal derivado del punto de captación del Canal Ambato- Huachi Pelileo – Río Ambato	Ambato- Tungurahua	27/08/2018	8.85	7.04	8.04	4.85	6.36	6.60	9.02
Segundo ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	7.40	7.20	6.73	5.21	6.30	6.81	9.12
Río Portoviejo	Portoviejo – Manabí	11/09/2018	8.23	5.71	-	-	-	-	7.85
Punto de captación del canal del río Guachalá - Yaruqui	Quito- Pichincha	06/08/2018	7.39	7.04	-	-	5.89	6.96	8.85
Río Cutuchi- Latacunga sector la FAE	Cotopaxi - Latacunga	20/08/2018	8.28	7.75	4.86	4.68	6.89	6.39	9.44
Segundo ramal derivado del punto de captación Naranjito	Naranjito- Guayas	03/10/2018	6.15	4.49	-	-	-	-	6.09
Río Daule	Daule - Guayas	02/10/2018	7.18	6.29	7.18	-	-	-	7.65
Punto de captación del canal del río Chico	Rocafuerte- Manabí	10/09/2018	7.01	5.26	-	-	-	-	6.11
Canal de riego del sector Mundug	Patate - Tungurahua	03/09/2018	8.80	6.67	-	-	-	-	8.43
Río Guachalá- Cayambe	Cayambe - Pichincha	06/08/2018	9.05	7.23	4.54	4.51	6.49	7.47	8.73
Primer ramal derivado del punto de captación Santa Lucía	Santa Lucía- Guayas	02/10/2018	10.08	5.54	-	-	-	-	7.24
Río Cutuchi- Patate	Patate - Tungurahua	03/09/2018	7.32	7.14	5.42	4.97	6.03	7.60	8.41
Punto de captación del canal del río Daule	Nobol - Guayas	02/10/2018	8.40	6.08	-	5.17	-	5.32	7.14

## **ANEXO B**

**DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE ARGs (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY</sub>, *mcr-1*, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>) POR MEDIO DE PCR CONVENCIONAL (PCR) EN MUESTRAS DE AGUAS Y SEDIMENTOS DE CANALES DE RIEGO Y DE RÍOS**



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa  
Muestras de aguas y sedimentos positivas para *bla<sub>OXA48</sub>*.(\*aguas)

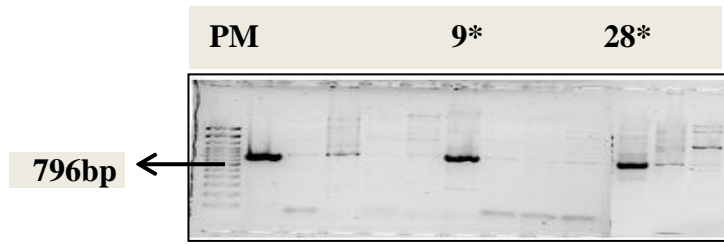


**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa  
Muestras de aguas y sedimentos positivas para *bla<sub>KPC</sub>*.(\*aguas)

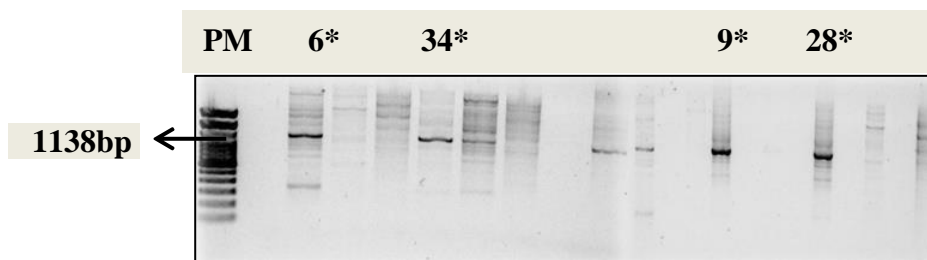


**Figura 11.** Electroforesis en gel de agarosa  
Muestras de aguas y sedimentos positivas para *bla<sub>CTX</sub>*.(\*aguas)





**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa  
Muestras de aguas y sedimentos para *bla<sub>SHV</sub>* (\*aguas)



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa  
Muestras de aguas y sedimentos positivas para *bla<sub>CMY</sub>*. (\*aguas)

**ANEXO C**

**PUNTOS DE MUESTREO  
POR PROVINCIAS**



**Figura 14.** Puntos de muestreo de las provincias: Manabí, Guayas, Cotopaxi , Pichincha y Tungurahua.

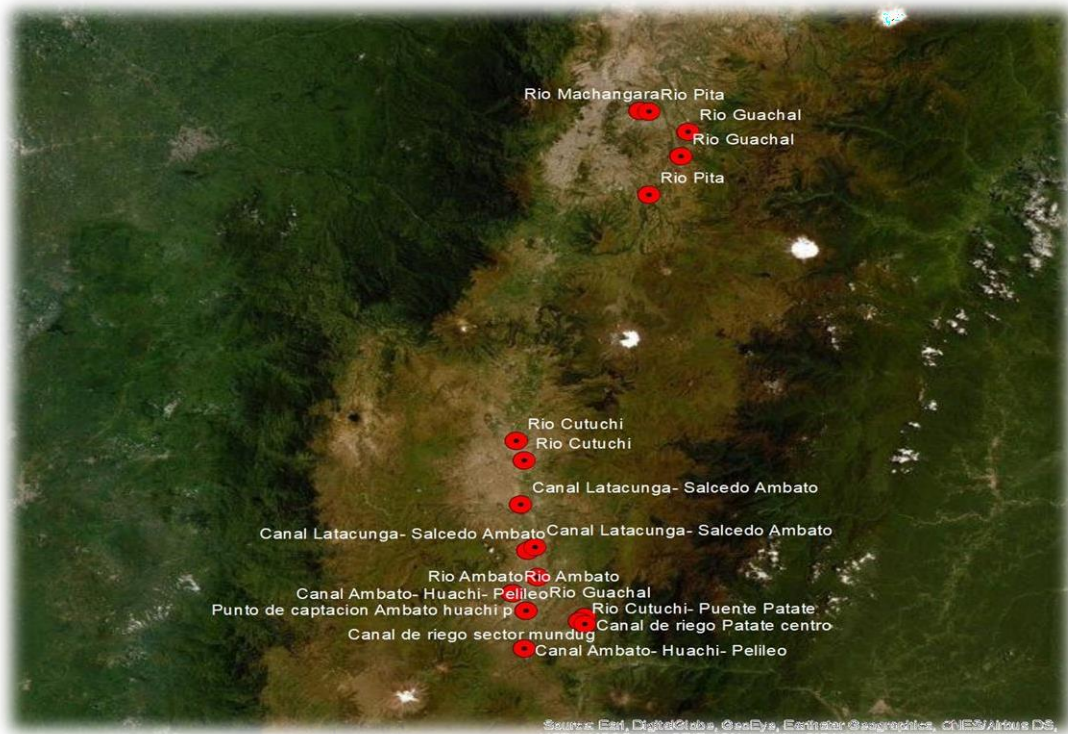


**Figura 15.** Puntos de muestreo de la provincia de Manabí



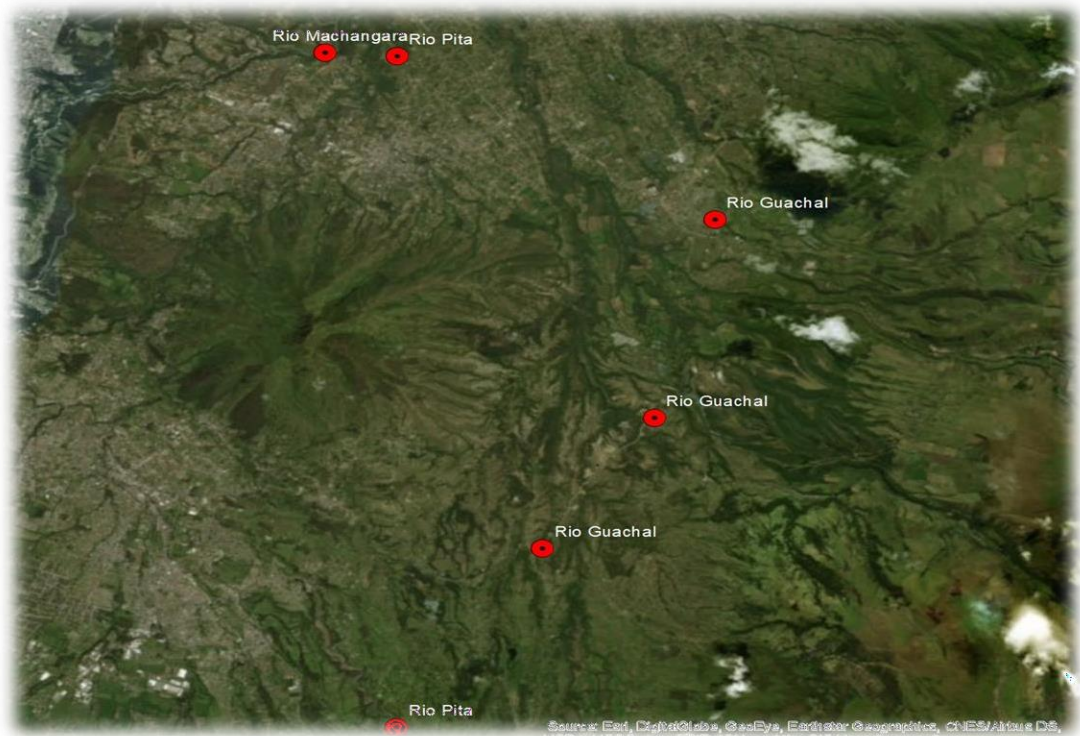


**Figura 16.** Puntos de muestreo de la provincia del Guayas

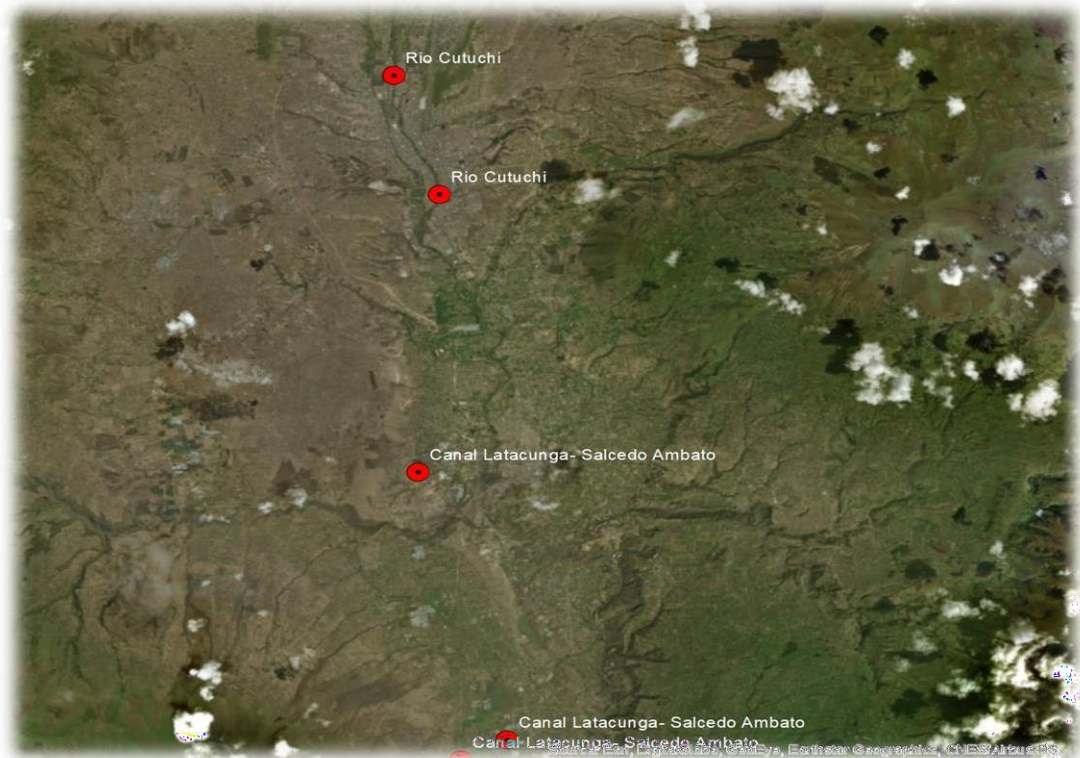


**Figura 17.** Puntos de muestreo de las provincias: Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua.





**Figura 18.** Puntos de muestreo de la provincia de Pichincha



**Figura 19.** Puntos de muestreo de la provincia de Cotopaxi

