

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



**“PERSISTENCIA DE BACTERIAS ENTÉRICAS RESISTENTES
Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUSTRATOS
SUPLEMENTADOS CON GALLINAZA COMERCIAL Y DE
COMPOSTAJE TRADICIONAL”**

El estudio es parte del proyecto: “EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR MEDIO DEL ESTIÉRCOL DE GALLINA” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por La Dirección de Investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución, 1568-CU-P-2017.

Jandry David Bohórquez Pucha

TUTOR: PhD. William Ricardo Calero Cáceres

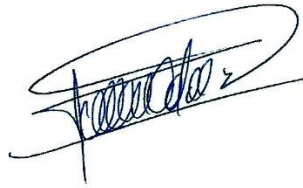
Cevallos – Ecuador

2020

APROBACIÓN

“PERSISTENCIA DE BACTERIAS ENTÉRICAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUSTRATOS SUPLEMENTADOS CON GALLINAZA COMERCIAL Y DE COMPOSTAJE TRADICIONAL”

REVISADO POR:



.....
Dr. William Calero Cáceres PhD.

TUTOR

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PERSISTENCIA DE BACTERIAS ENTÉRICAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUSTRATOS SUPLEMENTADOS CON GALLINAZA COMERCIAL Y DE COMPOSTAJE TRADICIONAL”

APROBADO POR LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL:

FECHA:



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

20-10-2020

Ing. Marco Pérez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JORGE ENRIQUE
DOBRONSKI ARCOS**

Ing. Jorge Dobronski Arcos

15-10-2020

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**JORGE RICARDO
GUERRERO LOPEZ**

18-10-2020

Ing. Ricardo Guerrero

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORIA DE LA INVESTIGACION

El suscrito, JANDRY DAVID BOHÓRQUEZ PUCHA, portador de cédula de ciudadanía número: 180384443-8, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “PERSISTENCIA DE BACTERIAS ENTÉRICAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUSTRATOS SUPLEMENTADOS CON GALLINAZA COMERCIAL Y DE COMPOSTAJE TRADICIONAL” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



JANDRY DAVID BOHÓRQUEZ PUCHA

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “PERSISTENCIA DE BACTERIAS ENTÉRICAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN SUSTRATOS SUPLEMENTADOS CON GALLINAZA COMERCIAL Y DE COMPOSTAJE TRADICIONAL” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no ponga una ganancia económica potencial y se respete los derechos de propiedad intelectual del proyecto al cual está asociado, así como del director del mismo.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor y del proyecto al cual está adscrito, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la Publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

DEDICATORIA

A Dios y la Santísima Virgen del Cisne por haberme motivado, guiado y colmado de bendiciones, durante el transcurso de mi formación académica.

A mi papito Publio Bohórquez y mi mamita Luz Pucha por todo el esfuerzo realizado a lo largo de mi vida, por enseñarme el valor de las cosas, por darme ese amor incondicional, por corregirme, por sus consejos, por sus lecciones, por hacer de mi un hombre de bien, sin su apoyo y brío no hubiese podido llegar a cumplir esta meta tan importante en mi vida. Vivo y viviré orgulloso de tener los padres que tengo. LOS AMO

A Carlita Cruz, el amor de mi vida, mi fiel compañera, siempre viviré agradecido con Dios y mi Virgencita del Cisne por enviarme a la mejor mujer del mundo. Gracias infinitas por brindarme todo su apoyo, por toda su paciencia, por ayudarme a ser mejor persona, por no permitir que me rindiera en este último tramo, que fue muy duro, pero sobre todo por todo el amor que me da día a día. LE AMO

A mis hermanos, Jenson y Pamela, por soportarme y ayudarme a seguir en esos días más duros, por llenarme de felicidad, son los mejores.

A mis abuelitos, Francisco Pucha, María Jumbo y Bélgica Alvarado sabias personas, que me han sabido ayudar, aconsejar y llenar de amor. Y a Pedro Bohórquez que desde su partida siempre lo he sentido presente, ha iluminado mi camino y me cuida desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Santísima Virgen del Cisne por haberme bendecido, guiado y llenado de sabiduría para culminar una de mis metas propuestas. Por haberme protegido y colmado de fuerzas para superar los baches que se atravesaron durante estos 5 años de estudio.

Al Doctor William Calero, mi tutor de tesis que con el paso del tiempo se convirtió en un gran amigo. Gracias doc. por compartirme sus conocimientos, experiencias, anécdotas, las cuales me ayudaran a ser mejor en un futuro. Por abrirme las puertas del laboratorio, confiar en mi persona y ayudarme en todo momento. Un Dios le pague inmenso por ayudarme en la culminación de mi formación como profesional.

A cada uno de los profesores los cuales compartieron conmigo mi travesía universitaria, que me brindaron su amistad y apoyo en ciertos momentos de penumbra. Por todo su conocimiento impartido dentro y fuera de las aulas, el cual hará de mi un mejor profesional.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato por brindarme el servicio de sus instalaciones y ayudarme en mi formación como Ingeniero Agrónomo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.- MARCO TEORICO	12
1.1 Antecedentes investigativos	12
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo general	15
1.2.2 Objetivos específicos	15
1.3 Hipótesis	16
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA	17
2.1 Materiales y equipos.....	17
2.2 Métodos	18
2.2.1 Cuantificación de heterótrofos (aerobios), coliformes y Escherichia coli (totales y resistentes).....	18
2.2.2 Protocolo de extracción de DNA Bacteriano para muestras sólidas (Powersoil DNA Isolation Kit, MoBio Lab, Inc, USA).	19
2.2.3 Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica TaqMan para los genes sul1, blaTEM, tetW, qnrS y 16S rDNA.....	20
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Análisis y discusión de resultados	22
3.2 Verificación de hipótesis	40
3.3 Discusión	40
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
4.1 Conclusiones	44
4.2 Recomendaciones	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de qPCR con sondas TaqMan	20
Tabla 2. Pocillos: Placas de PCR y qPCR Thermo Fisher Scientific.....	21
Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de primers y sondas de qPCR.....	21
Tabla 4. Prueba de comparación de tratamiento por tiempo (Bacterias)	36
Tabla 5. Prueba de comparación por tratamiento (Bacterias)	38
Tabla 6. Prueba de comparación de tratamiento por tiempo (DNA)	39
Tabla 7. Prueba de comparación por tratamiento (DNA)	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales (Sustrato).....	23
Gráfico 2. Persistencia de bacterias <i>E. coli</i> (Sustrato)	24
Gráfico 3. Persistencia de bacterias Coliformes (Sustrato).....	25
Gráfico 4. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos (Sustrato).....	26
Gráfico 5. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales (Comercial)	27
Gráfico 6. Persistencia de bacterias <i>Escherichia coli</i> (Comercial).....	28
Gráfico 7. Persistencia de bacterias Coliformes (Comercial)	29
Gráfico 8. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos (Comercial)	30
Gráfico 9. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales (Compostaje tradicional)..	31
Gráfico 10. Persistencia de bacterias <i>Escherichia coli</i> (Compostaje tradicional)	32
Gráfico 11. Persistencia de bacterias Coliformes (Compostaje tradicional).....	33
Gráfico 12. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos (Compostaje tradicional)	34

RESUMEN

El uso de abonos de origen animal en los suelos agrícolas representa una práctica habitual, ya que favorece la obtención de mejores rendimientos del suelo para la producción de alimentos a un costo reducido. Esta práctica supone un uso eficiente de los residuos de origen animal, favoreciendo el reciclaje de materia orgánica y nutrientes. El compostaje transforma de una manera eficiente y segura los estiércoles animales en insumos apropiados para su uso en el campo. Sin embargo, muchos agricultores continúan aplicando prácticas ancestrales y aplican abonos compostados tradicionalmente, que consta en un secado simple del abono animal para posteriormente aplicarlo directamente al suelo. Los elevados niveles de bacterias entéricas presentes en estas matrices pueden representar una vía de diseminación de organismos patógenos, los cuales potencialmente pueden integrarse dentro de la cadena alimentaria.

Por este motivo, se evaluó la persistencia de bacterias entéricas (heterótrofas, *E. coli*, coliformes) resistentes a antibióticos y la persistencia de los genes de resistencia a antibióticos (sulfametoxazol y ácido nalidíxico), en suelos suplementados con dos tipos de abono (abono de origen animal compostado tradicionalmente y abono de origen animal procesado por la industria) en un lapso de 111 días; determinando que la aplicación de estos abonos incrementa notablemente las densidades de bacterias entéricas resistentes (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en suelos. Estos contaminantes presentan una elevada persistencia a lo largo del tiempo, lo cual sugiere que la aplicación de abonos de origen animal, en especial cuando no reciben un tratamiento apropiado, pueden representar una vía de diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos a través de la cadena alimentaria.

ABSTRACT

The application of animal manure (fresh or composted) represents a common practice. This practice favors the increasing of organic matter into soils at reduced costs. The efficient use of the animal residues supporting the recycling of organic matter and nutrients. Compost practices transforms efficiently and safely animal manure into materials suitable for use into agricultural soils. However, the application of traditional practices to compost fertilizers, consisting of simple drying of the animal manure and later applying it directly to the soil is common. The high levels of enteric bacteria present in these matrices may represent a pathway for the spread of pathogenic organisms, which can potentially integrate within the food chain.

For this reason, the persistence of enteric bacteria (heterotrophic bacteria, *E. coli*, coliforms) resistant to antibiotics and the persistence of antibiotic resistance genes were evaluated in soils supplemented with two types of fertilizer (compost of animal origin traditionally composted and compost of animal origin processed by the industry) during 111 days; determining that the application of these fertilizers notably increases the densities of resistant enteric bacteria (ARBs) and antibiotic resistance genes (ARGs) in soils. These pollutants have a high persistence over time, which suggests that the application of fertilizers of animal origin, especially when they do not receive appropriate treatment, may represent a pathway for the spread of antibiotic resistance determinants throughout the chain. foo

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes investigativos

El mantenimiento de la calidad del suelo es una característica fundamental en la producción eficiente de alimentos; por lo que su conservación es crítica en los procesos agropecuarios y ambientales (**Bueno et al. 2016**). Esta actividad constituye un proceso complejo, considerando que se trata de un hábitat heterogéneo y que contiene una variedad de nichos ecológicos influenciados por características bióticas y abióticas (**Cabrera-Mireles et al. 2019**). Diversas investigaciones afirman que un gramo de suelo encontramos entre $10^6 - 10^9$ células bacterianas, pertenecientes a miles de especies diferentes, las cuales cumplen una gran cantidad de funciones ecológicas (**Nesme y Simonet 2015**). Es por esto que se lo considera como un prominente reservorio de microorganismos, y considerando su abundancia, constituye un medio adecuado que favorece al intercambio de material genético por medio de transferencia horizontal de genes (HGT) entre microorganismos (**Perry y Wright 2014**). La influencia de estresores químicos, como los antibióticos y otras sustancias antropogénicas, favorece los episodios de mutación y HGT, permitiendo la adaptación de las bacterias por medio de la expresión de mecanismos de resistencia (**Fernández Terry et al. 2015**)

Se prevee que para el año 2050, la población mundial se aproxime a los 9.700 millones, que demandarán una mayor cantidad de alimentos, induciendo a mayores problemas ambientales a causa de la producción agrícola intensiva (**Skaf et al. 2019**). El uso indiscriminado de antibióticos, en especial en el sector agropecuario, ha modificado el microbioma global, aumentando las tasas de microorganismos resistentes los cuales se pueden diseminar a través de la cadena alimentaria (**Davies y Davies 2010**). En la actualidad, uno de los principales objetivos de desarrollo sostenible es garantizar la seguridad alimentaria de la humanidad (**United Nations 2019**); por lo que, una de las alternativas es el uso de sistemas de agricultura orgánica como medio para lograr el

objetivo establecido, ya que es un sistema compuesto por procesos ecológicos, los cuales suplen el uso de insumos sintéticos para la producción de cultivos y ganado (Zhang et al. 2019, Eyhorn et al. 2019).

La aplicación de abonos orgánicos de origen animal es considerada como una buena práctica dentro de la agricultura orgánica, la cual nos proporciona mejoras en las propiedades del suelo (de Melo et al. 2019). Sin embargo, existen una vasta cantidad de evidencias que relacionan al uso de estiércol de animales de producción, con la diseminación de contaminantes biológicos y químicos; como antibióticos, bacterias entéricas y genes de resistencia a antibióticos en campos de cultivo (Cytryn 2013, Chen et al. 2016, Heuer et al. 2011, Udikovic-Kolic et al. 2014). Diferentes estudios afirman que las enterobacterias representan un grave problema de contaminación del suelo (Xie et al. 2016); debido a la excesiva aplicación de los abonos en estado fresco, los cuales contienen grandes poblaciones bacterianas, entre ellas *Escherichia coli* (Urrea et al. 2019). Recientes investigaciones comprobaron que las excretas de gallinas y cerdos son portadoras de grandes cantidades de bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs), en relación a las excretas de bovinos (Wang et al. 2020). En una investigación realizada en Ecuador, la presencia de *E. coli* en suelos es significativa debido al amplio uso de gallinaza en los suelos cultivables (Muñoz Tarira y Tomalá Muñoz 2019). Estudios apuntan que estas enterobacterias son catalogadas como un contaminante ambiental emergente (Pérez-Valera et al. 2019).

E. coli es un género de bacterias cohabitantes del tracto gastrointestinal, la cual agrupa una serie de patotipos que pueden resultar patógenos para los humanos y animales (Somorin et al. 2016). De la misma forma, las enterobacterias puede albergar diferentes mecanismos de virulencia y resistencia, como los ARGs (Cook et al. 2014). Esta bacteria y sus genes presentan una elevada persistencia en ecosistemas no comunes para ellas (Xu et al. 2019). Motivo por el cual, es necesario evaluar el impacto ambiental y sanitario que podría tener el uso de los residuos de origen animal en la producción alimentaria, los cuales provienen de animales que reciben suplementación de antibióticos, como terapéuticos o promotores de crecimiento (Chen

et al. 2019). Por ejemplo, investigaciones realizadas hallaron diecisiete antibióticos veterinarios en suelos de granjas orgánicas suplementados con estiércol, en donde se encontró sulfonamidas, tetraciclinas, oxitetraciclinas entre otros (**Tao et al. 2014**).

La presencia de bacterias y los genes de resistencia a los antibióticos en el suelo transmitidos por la suplementación de estiércoles como abono representa una gran preocupación en la actualidad, por su gran potencial de transmitirse a través de la cadena alimentaria (**Eyhorn et al. 2019**). Motivo por el cual, es necesario evaluar el impacto ambiental que podría tener el uso de estos residuos, los cuales provienen de animales que reciben suplementación de antibióticos, como terapéuticos o promotores de crecimiento (**Chen et al. 2019**).

En la actualidad, los ARGs son considerados contaminantes emergentes, considerando su presencia cada vez mayor en ambientes influenciados por la actividad antropogénica. Estos genes tienen la posibilidad de integrarse dentro de los genomas de las poblaciones autóctonas, pertenecientes a los nichos ecológicos receptores por medio de episodios de HGT (**Pruden et al. 2006**). Su abundancia en el medio ambiente está directamente relacionada a la influencia de actividades humanas y animales (**Pruden et al. 2012**). La persistencia de estos contaminantes en el suelo es un factor a tomar en cuenta, ya que ciertos autores manifiestan que los ARGs en los suelos adyacentes a corrales de cerdos de engorde abandonados, es similar a los suelos de corrales activos; es decir, que se sobreponen a toda alteración climática y/o natural en el lapso de periodos largos (**Li et al. 2019**). Estas características son perjudiciales, tanto para el suelo como para los seres humanos, ya que estos se pueden diseminar a través de los cultivos. Cabe recalcar que los cultivos de mayor peligro son aquellos que son consumidos en fresco como, por ejemplo: lechugas, rábanos, zanahorias, nabos, entre otros; ya que no reciben un tratamiento térmico que potencialmente inactiva a estos contaminantes (**Schutzius et al. 2019**).

La producción de huevos en la zona centro del Ecuador (Tungurahua y Cotopaxi), representa aproximadamente el 60% a nivel nacional (**Rickie y Gast 2017**); y la utilización de gallinaza en cultivos de hortalizas es habitual en esta zona, motivo por

el cual la presente investigación pretende evaluar la persistencia de las bacterias entéricas y genes de resistencia presentes en gallinaza (compostada de manera tradicional y de origen comercial) en sustratos, simulando su comportamiento habitual en cultivos de hortalizas, con la finalidad de conocer el efecto de las condiciones naturales influenciadas por la reducción e inactivación de bacterias y genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica. Para lo cual, se aplicarán métodos agronómicos, microbiología convencional y biología molecular (PCR cuantitativa).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la persistencia de bacterias entéricas resistentes y genes de resistencia a antibióticos en sustratos suplementados con gallinazas comercial y de compostaje tradicional.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar las densidades de bacterias entéricas (*E. coli*, coliformes totales) y heterótrofas (totales y resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), en sustratos suplementados con gallinazas (comercial y compostaje tradicional), durante 111 días.
- Evaluar el comportamiento de las densidades de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica (*bla_{TEM}*, *sull*, *qnrS*, *tetW* y del gen 16S rDNA), en sustratos suplementados con gallinazas (comercial y de compostaje tradicional), durante 111 días.
- Valorar los niveles de inactivación de bacterias entéricas, heterótrofas (totales, resistentes), y genes de resistencia a antibióticos provenientes de las gallinazas comercial y compostaje tradicional.

1.3 Hipótesis

Ha: Los sustratos suplementados con gallinazas comercial y de compostaje tradicional influyen en las densidades de persistencia de bacterias entéricas resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en los suelos, durante 111 días.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales y equipos

El proyecto requirió de los siguientes materiales:

- Agar Chromocult
- Agar MacConkey
- Agar Luria Bertani (LB)
- Caldo (LB)
- Solución tampón Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Cajas Petri
- Azas de dispersión
- Botellas de cristal tapa azul (1000ml, 500ml, 100ml)
- Pipetas
- Pera de succión
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Tubos falcon
- Tubos de ensayo
- Tubos de vidrio tapa rosca
- Frascos de orina estériles
- Mechero
- DNeasy PowerSoil Kit
- Estándares para qPCR (*sulI*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *tetW*.)

A continuación, enumeramos los equipos usados:

- Refrigerador
- Incubadora

- Cabina de bioseguridad tipo II.
- Balanza analítica (cap: 500g; 0,1g)
- Baño maría
- Vórtex (Equipo utilizado para mezclar pequeños frascos con líquido)
- Centrífuga
- Agitador magnético
- Termociclador en tiempo real (7500 Fast Real Time System, Applied Biosystems).

2.2 Métodos

2.2.1 Cuantificación de aerobios, coliformes y *Escherichia coli* (totales y resistentes)

Los contajes de bacterias aeróbicas y *E. coli* fueron evaluados por el método de filtración de membrana de acuerdo al método ISO 9308:1-2014 (International Organization for Standardization 2014).

Las muestras sólidas fueron previamente homogenizadas con PBS 1x en una proporción 1/10 por medio de agitación vertical a 900 osc/min; o magnética, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 300 g durante 3 minutos para descartar los sólidos suspendidos; o bien se dejó decantar durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en otro recipiente estéril.

- 1) Se preparó diluciones seriadas de acuerdo a la carga estimada de microorganismos, usando PBS 1x.
- 2) Se colocó 100 µL de dilución en el medio de cultivo deseado (LB para aeróbicas totales), con antibiótico (ácido nalidíxico, sulfametoxazol) y sin antibiótico y agar Chromocult® para coliformes totales y *E. coli* con antibiótico (ácido nalidíxico, sulfametoxazol) y sin antibiótico y con un asa de drigalski se esparce la dilución en la placa.
- 3) Se etiquetó.
- 4) Las cajas Petri fueron colocadas en el incubador microbiológico durante 18-24 h a 37°C.

- 5) Se cuantificó los microorganismos existentes en las cajas Petri con medios de cultivo.

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

1. Se añadió 0,25 g de muestra a tubos PowerBeads incluidos en el kit y se mezcló por vórtex vigorosamente.
2. Se añadió 60 µL de la solución C1 y se mezcló por vórtex
3. Se colocó los tubos dentro del vórtex Mo-Bio de manera horizontal y se agitó a máxima velocidad durante 10 minutos.
4. Se centrifugó los tubos a 10.000 XG durante 30 segundos a temperatura ambiente. Fue transferido el sobrenadante a un tubo de micro centrifuga.
5. Se añadió 250 µL de la solución C2 y se mezcló por vórtex durante 5 segundos. Se puso a incubar a 4°C durante 5 minutos; se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000XG, y posteriormente fue transferido 600µL del sobrenadante a un nuevo tubo.
6. 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. Fue transferido 750 µL del sobrenadante a un nuevo tubo.
7. Se mezcló la solución C4 antes de utilizar, se añadió 1200 µL de la solución C4 al sobrenadante y se usó vórtex durante 5 segundos.
8. Se colocó aproximadamente 675 µL dentro del filtro provisto dentro del Kit, y se puso a centrifugar a 10.000 XG por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el líquido. Se repitió el proceso hasta terminar el líquido.
9. Se añadió 500 µL de la solución C5 y se centrifugó a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 XG. Se descartó el flujo.
10. Se puso a centrifugar nuevamente a temperatura ambiente por 1 minuto a 10.000 XG.
11. Cuidadosamente se colocó el filtro en un tubo de micro centrifuga limpio y se añadió 100 µL de la solución C6 al centro de la membrana. Se puso a centrifugar a temperatura ambiente durante 30 segundos a 10.000 XG, y se descartó el filtro.

12. Se almacenó el DNA en congelación entre -20°C y -80°C.

2.2.3 Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica TaqMan para los genes *sul1*, *blaTEM*, *tetW*, *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 1.

Tabla 1. 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	ADN bacteriano

A continuación, se seguirán 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 Eppendorf.
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 (Tabla 2).
4. Se colocó la placa en el termociclador y se analizó la gráfica de amplificación.
Las secuencias de nucleótidos de los primers y sondas de qPCR a ser utilizadas se las describe en la (Tabla 3).

Tabla 2. Pocillos: Placas de PCR y qPCR Thermo Fisher Scientific.

	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

Tabla 3. Secuencia de nucleótidos de primers y sondas de qPCR.

GEN	PRIMER	SECUENCIA (5'- 3')	REFERENCIA
<i>bla_{TEM}</i>	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	(Lachmayr et al. 2009)
	LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	
	Sonda	6FMA-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ	
<i>sulI</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	(Modificado de Czekalski, Berthold, Caucci, Egli, & Burgmann, 2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT	
	Sonda	FAM-CGAGCCTTGCGGGCGG-MGBNFQ	
<i>tet_w</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 rRNA	UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	(Nadkarni et al. 2002)
	LP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
	Sonda	FAM-CGTATTACCGGGCTGCTGGCAC-MGBNFQ	
ermB	UP	GATACCGTTTACGAAATTGG	(Chen et al. 2007)
	LP	GATACCGTTTACGAAATTGG	

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

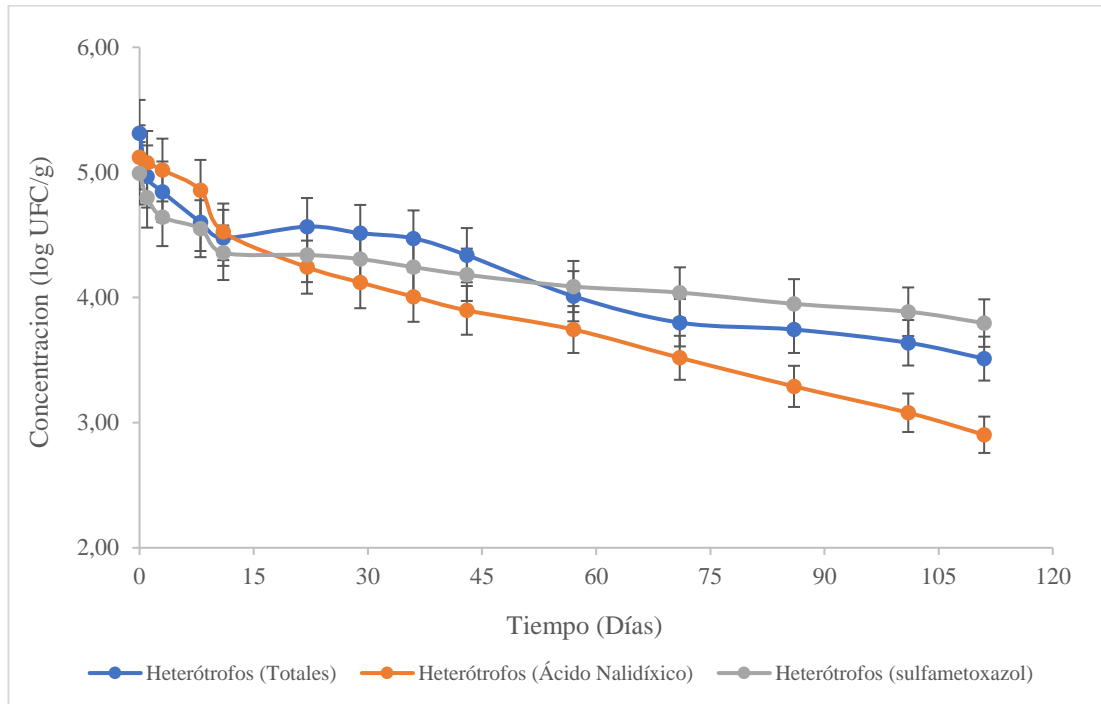
3.1 Análisis y discusión de resultados

Las densidades persistentes de bacterias y genes de resistencia a antibióticos se expresan a continuación en gráficas de densidad en función del tiempo. El análisis estadístico fue realizado comparando las densidades de bacterias y genes de los días 0 (inicial) y 111 (final). A continuación, se mostrarán los resultados ya tabulados y expresados en las siguientes gráficas, así como los resúmenes de los análisis de varianza y pruebas de Tukey realizadas. El análisis estadístico en general se encuentra detallado en anexos.

Como control de la influencia de la adición de gallinaza en las poblaciones bacterianas y de ARGs, se analizó las densidades basales de estos indicadores en el sustrato comercial TS1 a base de turba rubia, los cuales presentaron los siguientes resultados en función del tiempo.

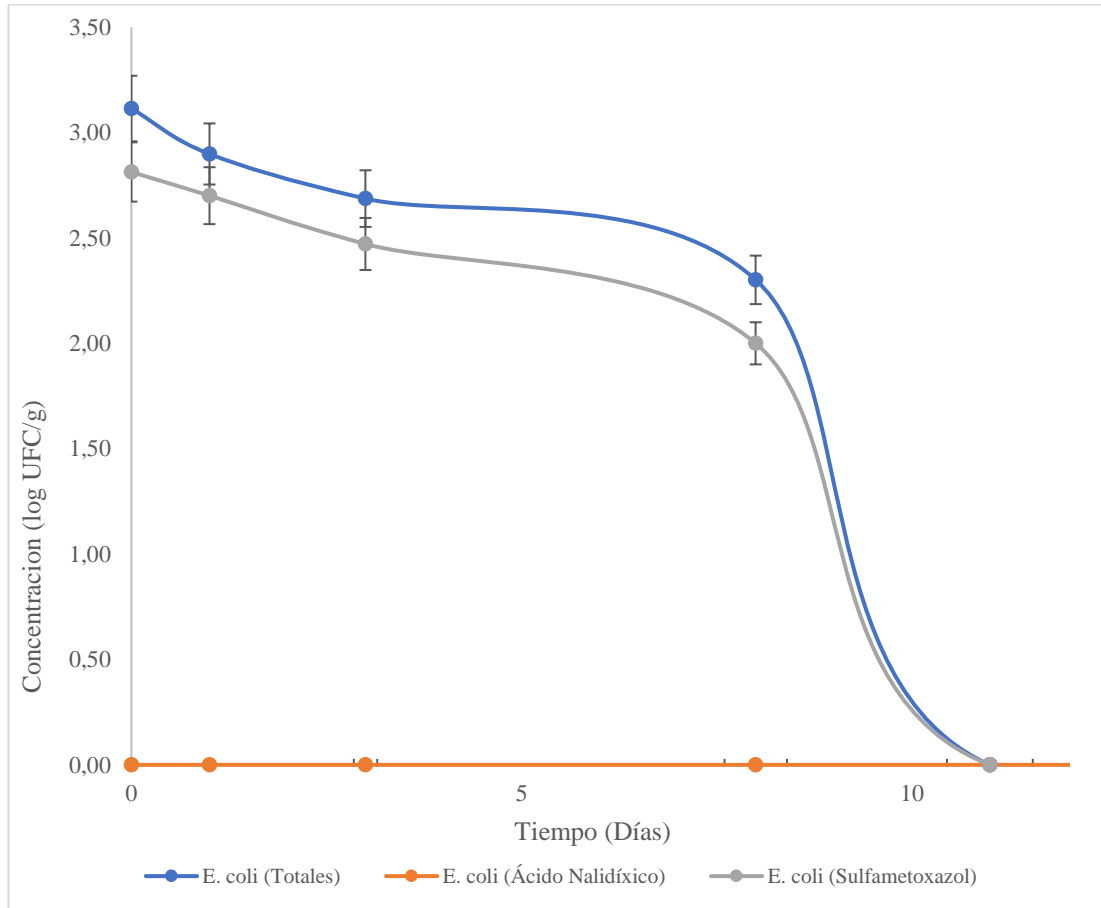
3.1.1 Resultados obtenidos con sustrato

Gráfico 1. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales



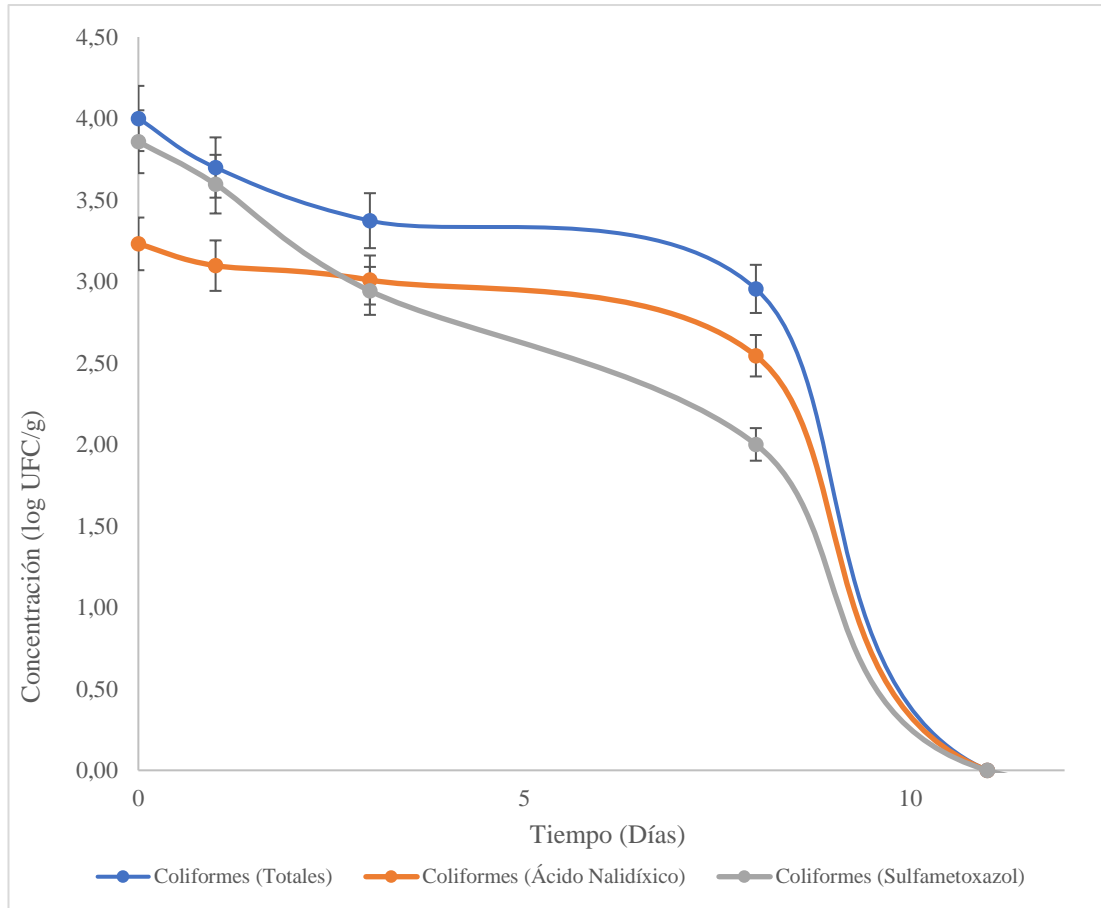
Las densidades basales de heterótrofos totales en el sustrato, se encuentran alrededor de 5 log UFC/g en las tres variantes analizadas (totales, resistentes a ácido nalidíxico y resistentes a sulfametoxazol). Se observa que, en el lapso de 111 días, sus densidades generales disminuyen en un rango aproximado entre 0.5 y 1 logaritmo por el efecto de la inactivación natural.

Gráfico 2. Persistencia de bacterias *E. coli*



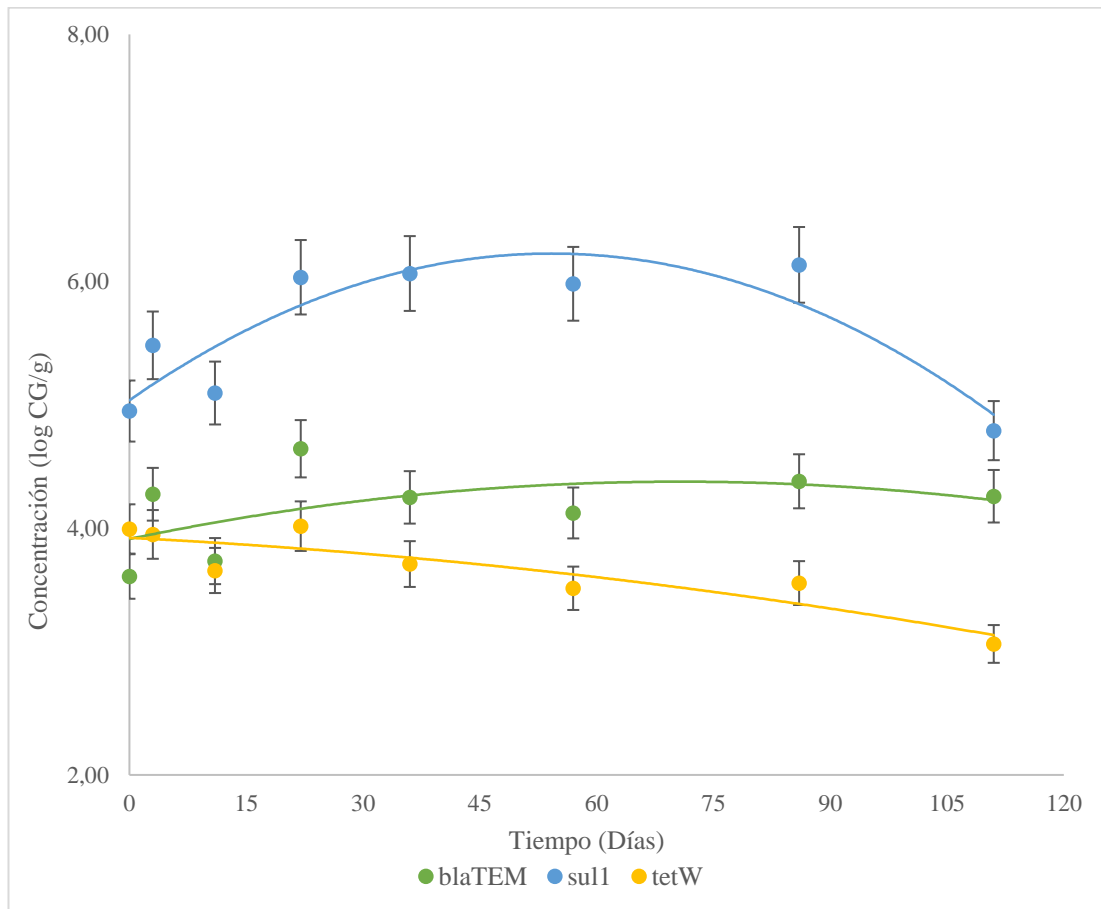
En el caso de *E. coli*, fue detectada en el orden de los 3 log UFC/g en las variantes totales y resistentes a sulfametoxazol. No se detectó *E. coli* resistente ácido nalidíxico. Se observa que a partir del día 11, las densidades de estas bacterias no son cuantificables, denotando que existe una inactivación natural de estos indicadores.

Gráfico 3. Persistencia de bacterias Coliformes



En el caso de los coliformes totales se observa un efecto similar al observado en *E. coli*, en donde las densidades de estas bacterias se encuentran por encima de los 3 log UFC/g (en todas las variantes), y no son detectables a partir del día 11, denotando que en el sustrato sin adición de gallinaza estas bacterias muestran una baja persistencia a la inactivación natural.

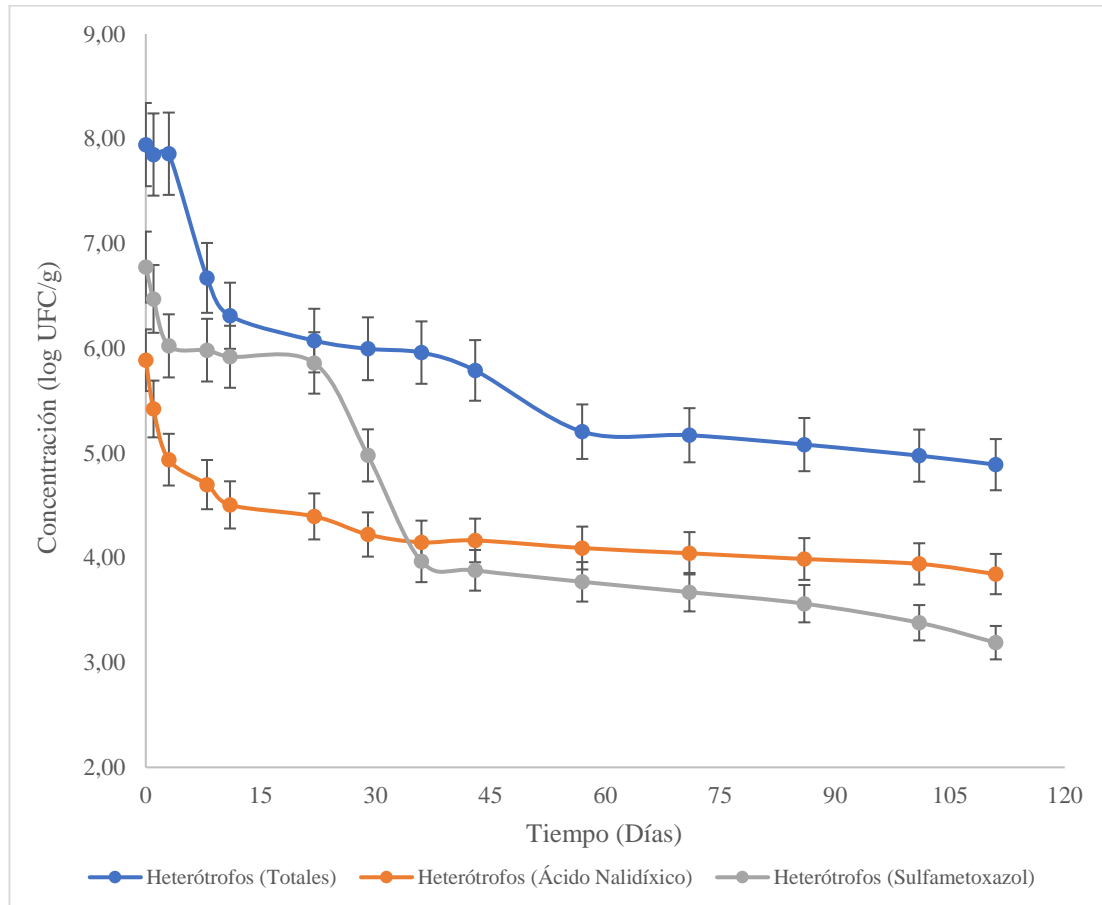
Gráfico 4. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos



Con respecto a los ARGs, únicamente fueron detectados los genes de resistencia a betalactámicos (*bla_{TEM}*), sulfonamidas (*sulI*) y tetraciclinas (*tetW*). No se detectaron densidades cuantificables de los genes de resistencia a quinolonas (*qnrS*), eritromicinas (*ermB*) ni del gen 16S rRNA. El gen con mayor presencia en esta matriz fue *sulI*, cuyas densidades permanecieron estables en el rango de los 5 log CG/g durante los 111 días de estudio. Los genes *bla_{TEM}* y *tetW* fueron detectados en el rango de los 4 log CG/g, mostrando el gen *sulI* sus densidades prácticamente inalteradas durante los 111 días de estudio; y en el caso del gen *tetW*, una inactivación cercana a 0.5 log CG/g al final del estudio.

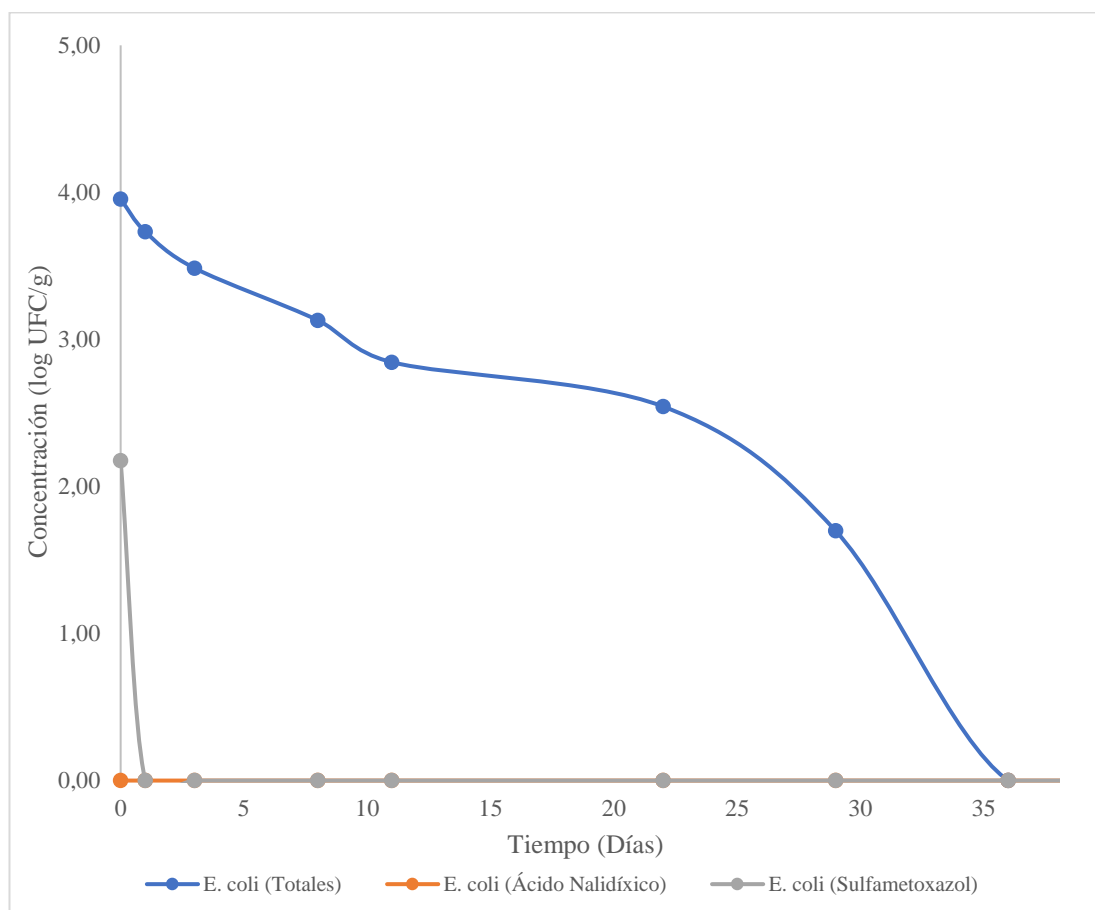
3.1.2 Resultados obtenidos con gallinaza comercial.

Gráfico 5. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales



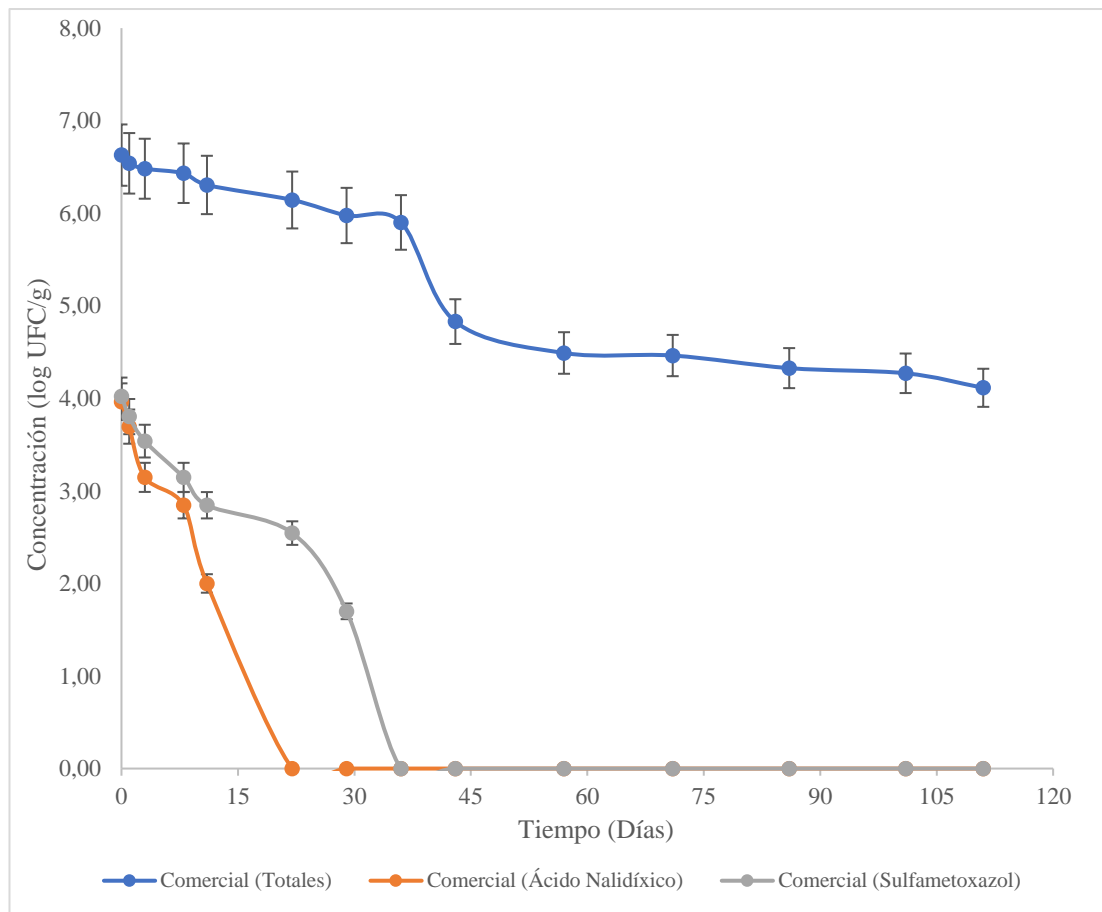
En el tratamiento solo sustrato, las densidades basales de heterótrofos encontradas fueron de 5 log UFC/g en sus tres variantes analizadas (totales, resistentes a ácido nalidíxico y resistentes a sulfametoxazol), en el tratamiento adicionado gallinaza comercial, se puede observar un incremento notorio entre 2 a 3 log UFC/g, dando como resultado densidades basales de heterótrofos entre 6 y 8 log UFC/g aproximadamente en sus tres variantes. Transcurrido los 111 días, las densidades bacterianas ha disminuido 2 log UFC/g en los heterótrofos resistentes a ácido nalidíxico y 3 log UFC/g en los totales y resistentes a sulfametoxazol por efecto de la inactivación natural, manteniendo un rango aproximado al obtenido en el tratamiento solo sustrato.

Gráfico 6. Persistencia de bacterias *Escherichia coli*



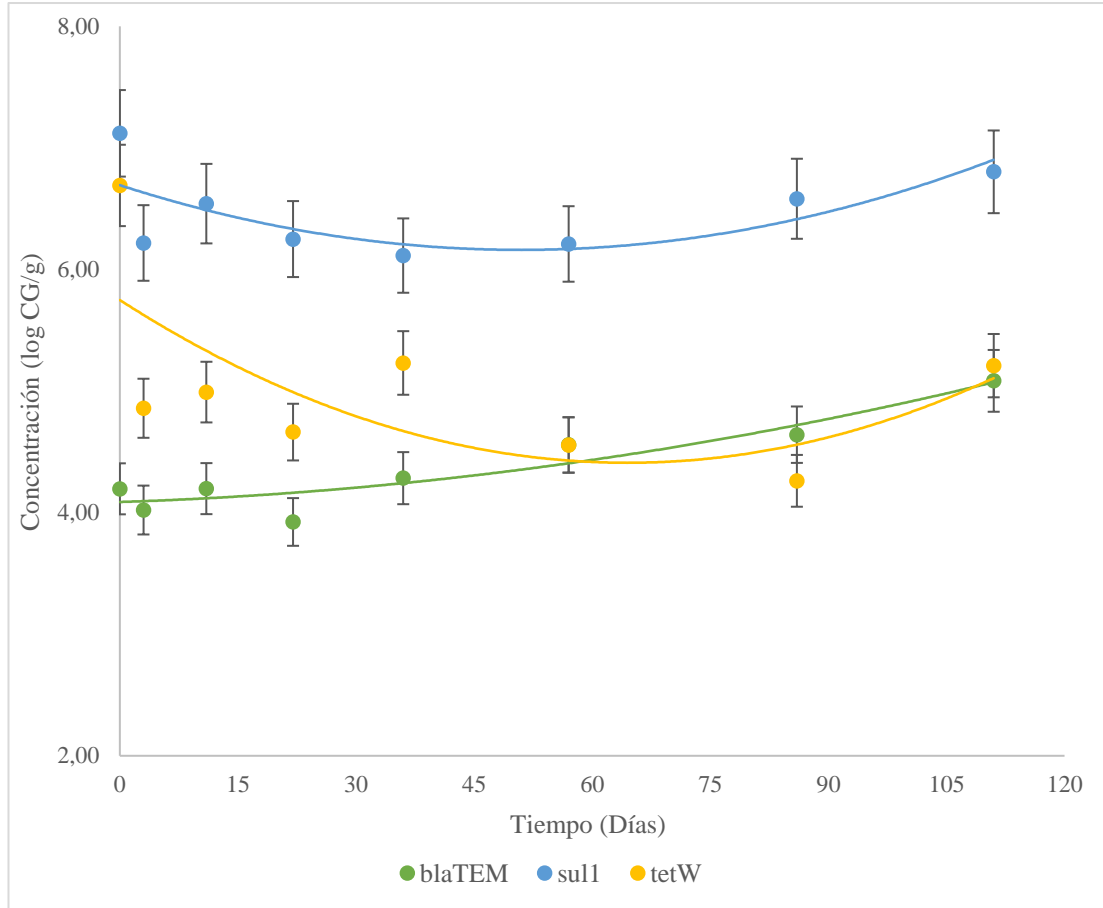
En el caso de *E. coli* en el tratamiento solo sustrato, fue detectada en el orden de los 3 log UFC/g en las variantes totales y resistentes a sulfametoxazol; en el caso del tratamiento adicionado gallinaza comercial, se puede observar un incremento aproximadamente de 1 log UFC/g en la variante totales y una disminución de 1 log UFC/g en la variante resistentes a sulfametoxazol. En la variante resistentes a ácido nalidíxico no se detectó *E. coli* tanto en el tratamiento de solo sustrato como en el tratamiento adicionado gallinaza comercial. En el tratamiento testigo se observa que, a partir del día 11 las densidades de estas bacterias no son cuantificables tanto para totales como para resistentes a sulfametoxazol, mientras que, en el tratamiento con gallinaza comercial, se observa que la inactivación de *E. coli* para las variantes resistentes a sulfametoxazol y totales se da al día 1 y 36 respectivamente.

Gráfico 7. Persistencia de bacterias Coliformes



En el caso de los coliformes totales en el tratamiento testigo, se observa un efecto en donde las densidades de estas bacterias se encuentran por encima de los 3 log UFC/g (en todas las variantes), y no son detectables a partir del día 11. Aquí se observa como existe un aumento de 3 y 1 log UFC/g en la variantes totales y resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol respectivamente. Al lapso de 111 días, se detectó que la variante coliformes totales presento en sus densidades generales una disminución de 2 log UFC/g; en las variantes resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol, se observa la inactivación de estas bacterias al día 22 y 36 respectivamente.

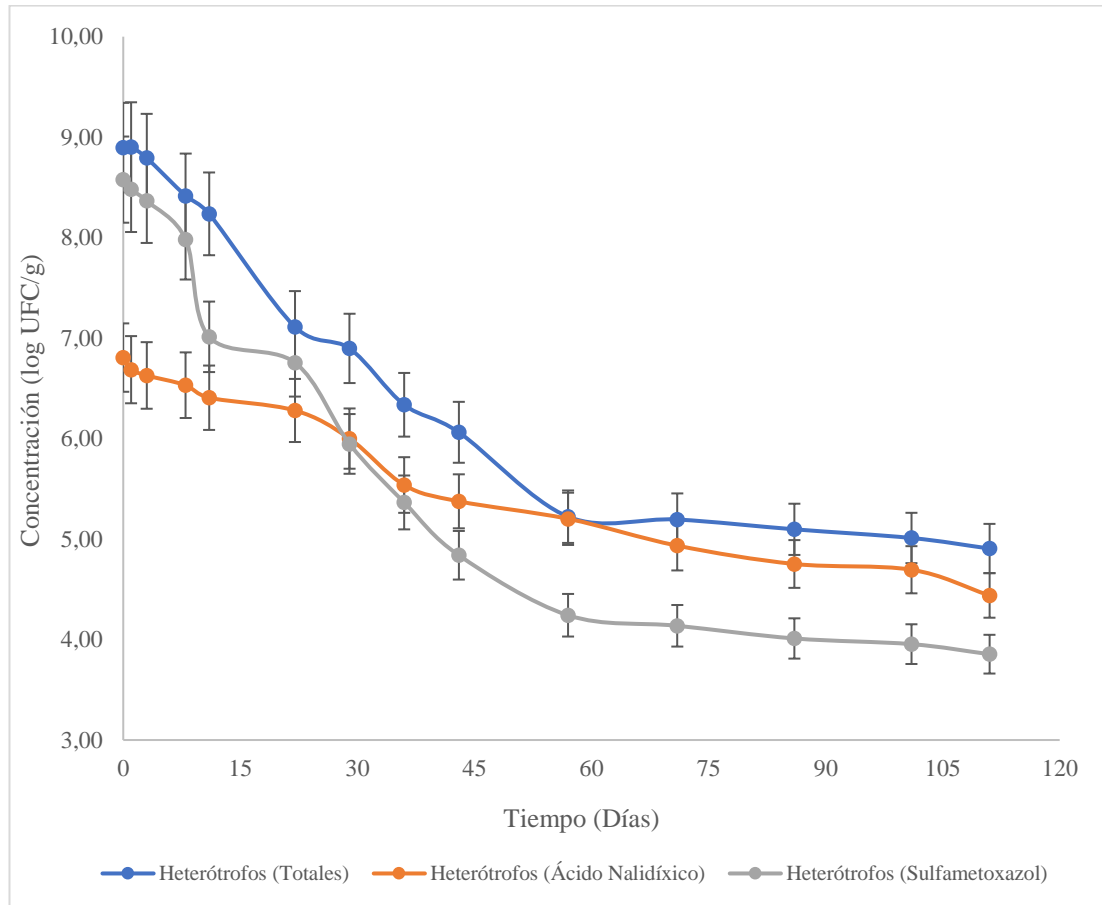
Gráfico 8. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos



En el tratamiento control, el gen con mayor presencia fue *sulI*, cuyas densidades permanecieron estables en el rango de los 5 log CG/g durante los 111 días de estudio; en el tratamiento con gallinaza comercial, *sulI* fue el gen que se mantuvo en un nivel de 7 log CG/g durante los 111 días, determinando un aumento de 2 log CG/g entre el tratamiento control y el tratamiento con adición de gallinaza comercial. El gen *tetW*, alcanzó aproximadamente los 7 log CG/g al día 0, disminuyendo alrededor de 2 log CG/g al día 3 y manteniéndose estable el resto de días de estudio, observando que existe un aumento de 2 log CG/g entre tratamientos durante los 111 días. Finalmente, el gen *bla_{TEM}*, en esta matriz alcanza 4 log CG/g en su inicio y el aumento de 1 log CG/g al día 111, determinando una similitud con el resultado obtenido en el tratamiento control.

3.1.3 Resultados obtenidos con gallinaza de compostaje tradicional

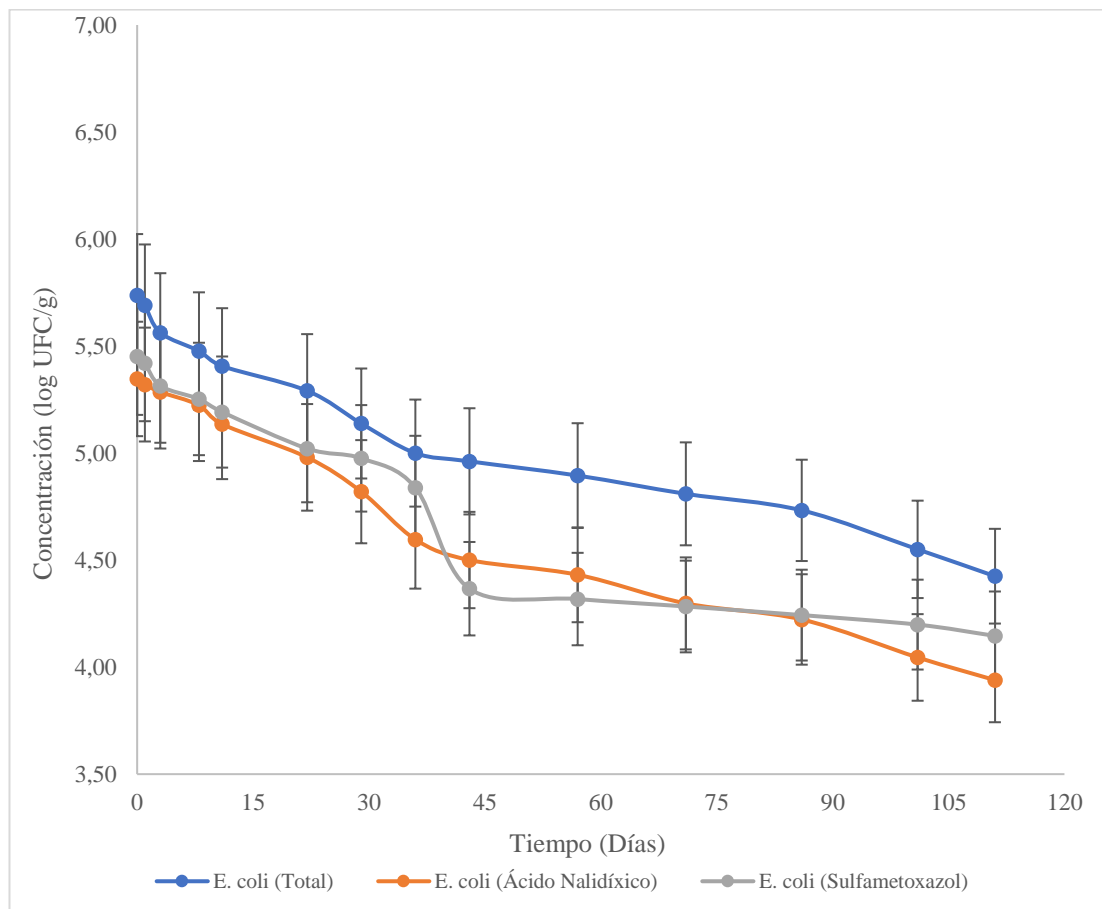
Gráfico 9. Persistencia de bacterias Heterótrofos totales



En la siguiente matriz se observa como los rangos han incrementado significativamente. En los totales, se observa un aumento de 3 log UFC/g con respecto al tratamiento control y una diferencia de 1 log UFC/g con el tratamiento adicionado gallinaza comercial, determinando que la adición de gallinaza de compostaje tradicional proporciona mayores densidades bacterianas con un valor de 9 log UFC/g. En el caso de los resistentes a sulfametoxazol, las densidades basales aumentan entre 2,5 y 3,5 log UFC/g referentes al control y gallinaza comercial correspondientemente. Para culminar, los resistentes a ácido nalidíxico, presentan un incremento de 2 log UFC/g con respecto a los otros tratamientos en estudio. Transcurridos los 111 días, la variante heterótrofos totales presenta una disminución de 4 log UFC/g, estableciendo que, en comparación con los otros dos tratamientos, las densidades bacterianas se

mantienen en un rango similar a 4 log UFC/g. Las variantes resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol, resultaron obtener un rango de densidad de 3 log UFC/g al pasar los 111 días de estudio.

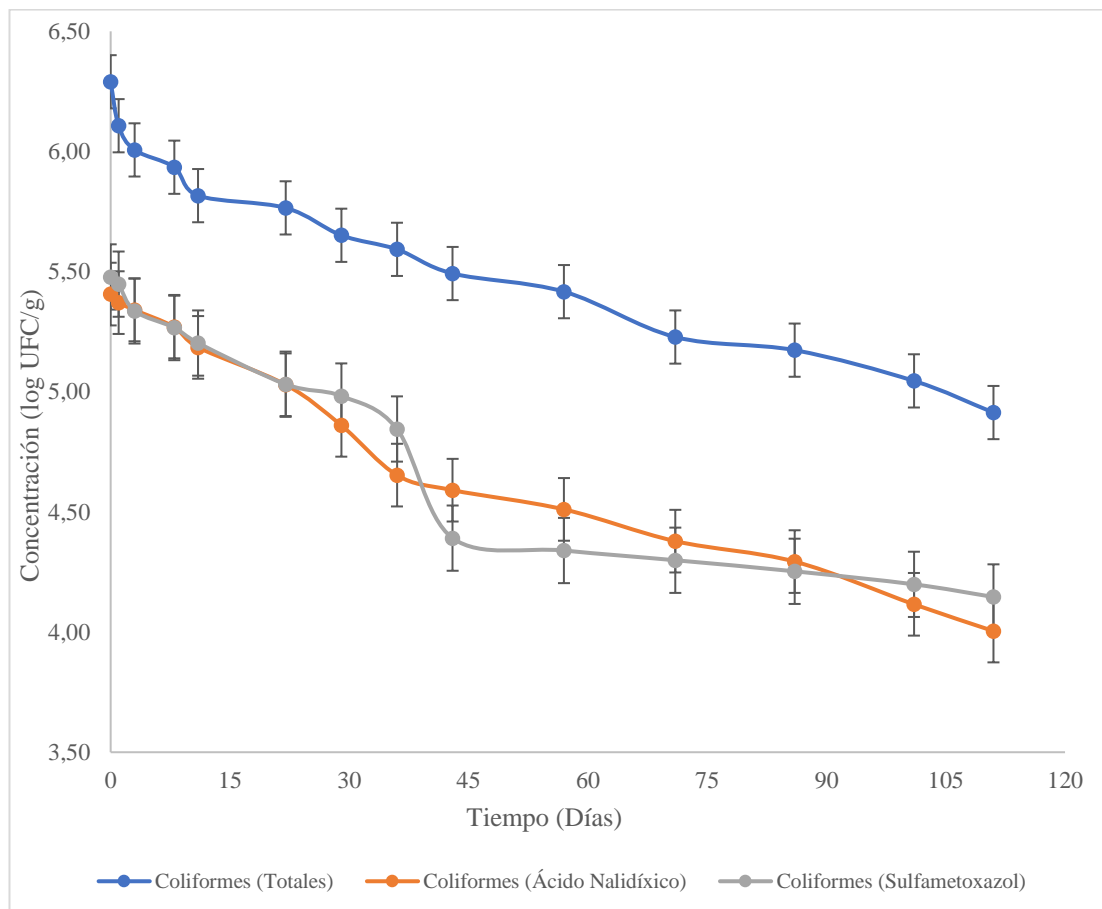
Gráfico 10. Persistencia de bacterias *Escherichia coli*



Como se puede observar en la siguiente gráfica, las densidades basales se encuentran en el rango de 5 log UFC/g en las tres variantes analizadas (totales, resistentes a ácido nalidíxico y resistentes a sulfametoxazol). Se observa un aumento de 2,5 log UFC/g en relación al tratamiento solo sustrato y adicionada gallinaza comercial. En los tratamientos anteriores, no se detectó presencia de la variante *E. coli* resistentes a ácido nalidíxico; caso contrario ocurre en el presente tratamiento, en donde se avista alrededor de 5 log UFC/g, al igual que en la variante resistente a sulfametoxazol, con

la diferencia que en los tratamientos control y adicionada gallinaza comercial, el rango de densidades basales esta entre 3 y 4 log UFC/g, es decir existe un aumento de 1 y 2 log UFC/g en este último tratamiento con respecto a los dos anteriores.

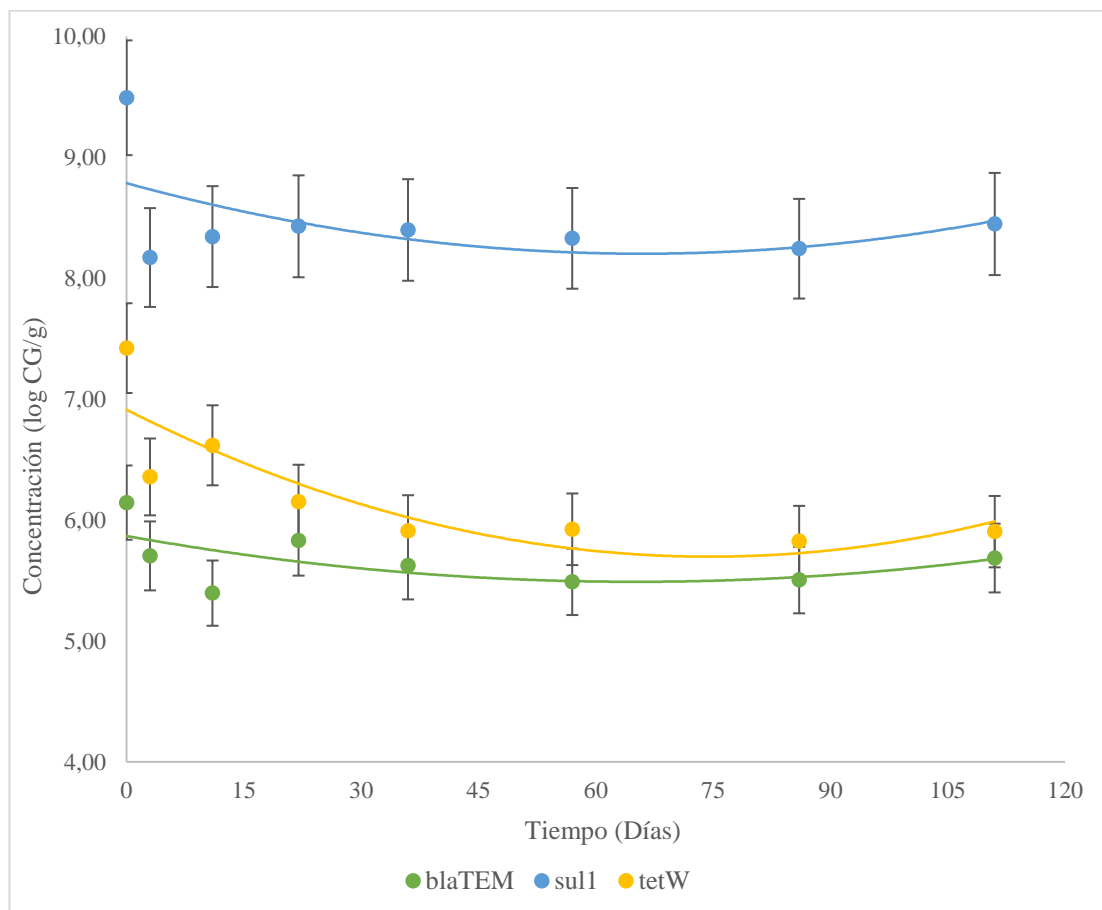
Gráfico 11. Persistencia de bacterias Coliformes



En esta matriz se observa que, la variante coliformes totales está en el rango de 6,5 log UFC/g aproximadamente, al igual que en el tratamiento con gallinaza comercial, caso que no ocurre con el tratamiento solo sustrato, en donde esta variante se encuentra por debajo del rango mostrado en la presente gráfica. Con respecto a las variantes resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol, identificamos que tenemos una densidad de 5,5 log UFC/g en el presente tratamiento, es decir, existe un aumento de 1,5 log UFC/g con relación a los demás tratamientos en estudio. Transcurridos los 111

días, se observa similitud en la persistencia de los coliformes totales con 4 log UFC/g tanto para el tratamiento de compostaje tradicional y con gallinaza comercial, debido a que en el control al día 11 se produjo la inactivación. En cuanto a las variantes coliformes resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol, se observan densidades entre 4 log UFC/g en el lapso de los 111 días, mientras que en el tratamiento control la inactivación de las bacterias resistentes a ácido nalidíxico y sulfametoxazol se produce a los 11 días, en el tratamiento con gallinaza comercial, la inactivación de las mismas se da a los 22 y 36 días respectivamente.

Gráfico 12. Persistencia de los genes de resistencia a antibióticos



En la siguiente matriz se observa que, el gen *sulI* presenta un incremento de 4 log CG/g con respecto al tratamiento control y 2 log CG/g con respecto al de gallinaza

comercial. Tras el paso de los 111 días se observa que se mantuvo estable, es decir en el rango de 9 CG/g. El gen *tetW* presenta un incremento de 3 log CG/g con respecto a los otros dos tratamientos en estudio, determinando que la adición de compostaje tradicional proporciona alrededor de 7 log CG/g, transcurridos los 111 días se produjo la inactivación de 1 log CG/g. Finalmente, el gen *bla*_{TEM} no muestra alteración durante los 111 días de estudio, manteniéndose en un rango de 6 log CG/g. A diferencia de los tratamientos solo sustrato y gallinaza comercial en donde se contempla variaciones de hasta 1 log CG/g durante los 111 días.

3.2 Evaluación

Tabla 4. Prueba de comparación de tratamiento por tiempo (bacterias)

	Días	SUSTRATO	SUSTRATO + GALLINAZA COMERCIAL	SUSTRATO + GALLINAZA COMPOSTAJE TRADICIONAL
<i>E. coli</i> Totales **	0	1,29 x 10 ³ D	8,98 x 10 ³ C	5,45 x 10 ⁵ A
	111	< 1 x 10 ² E (bld)	< 1 x 10 ² E	2,65 x 10 ⁴ B
<i>E. coli</i> resistentes a ácido nalidíxico **	0	6,12 x 10 ² C	1,45 x 10 ² D	2,22 x 10 ⁵ A
	111	< 1 x 10 ² E	< 1 x 10 ² E	8,64 x 10 ³ B
<i>E. coli</i> resistentes a sulfametoxazol **	0	< 1 x 10 ² C	< 1 x 10 ² C	2,82 x 10 ⁵ A
	111	< 1 x 10 ² C	< 1 x 10 ² C	1,40 x 10 ⁴ B
Coliformes totales **	0	1,65 x 10 ³ E	4,23 x 10 ⁶ A	1,95 x 10 ⁶ B
	111	< 1 x 10 ² F	1,29 x 10 ⁴ D	8,13 x 10 ⁴ C
Coliformes resistentes a ácido nalidíxico **	0	1,00 x 10 ⁴ B	9,12 x 10 ³ B	2,55 x 10 ⁵ A
	111	< 1 x 10 ² C	< 1 x 10 ² C	1,00 x 10 ⁴ B
Coliformes resistentes a sulfametoxazol **	0	7,24 x 10 ³ D	1,05 x 10 ⁴ C	3,02 x 10 ⁵ A
	111	< 1 x 10 ² E	< 1 x 10 ² E	1,40 x 10 ⁴ B
Heterótrofos totales **	0	1,32 x 10 ⁵ C	8,78 x 10 ⁷ B	7,88 x 10 ⁸ A
	111	7,94 x 10 ² E	7,70 x 10 ⁴ D	8,07 x 10 ⁴ D
Heterótrofos resistentes a ácido nalidíxico **	0	2,04 x 10 ⁵ C	7,70 x 10 ⁵ B	6,41 x 10 ⁶ A
	111	3,24 x 10 ³ F	7,03 x 10 ³ E	2,75 x 10 ⁴ D
Heterótrofos resistentes a sulfametoxazol **	0	9,85 x 10 ⁴ C	5,98 x 10 ⁶ B	3,72 x 10 ⁸ A
	111	6,26 x 10 ³ D	1,54 x 10 ³ E	7,13 x 10 ³ D

Prueba de TUKEY HSD

P < 0,01 (99%) ** Altamente significativo

P < 0,05 (95%) * significativo

Como se puede observar, en la comparación de tratamiento por tiempo en todas las variantes (*E. coli*, coliformes y heterótrofos totales, resistentes a ácido nalidíxico y resistentes a sulfametoxazol) existe una influencia altamente significativa;

determinando que, las concentraciones bacterianas más altas las encontramos en los tratamientos aplicados gallinaza de compostaje tradicional, seguidos por los tratamientos aplicados gallinaza comercial y en donde menos densidades bacterianas encontramos es en el tratamiento solo sustrato.

Para las variantes *E. coli*, coliformes y heterótrofos totales, resistentes a ácido nalidíxico y resistentes a sulfametoxazol se observa claramente como encontramos mayores densidades bacterianas tanto en el día 0 como al día final (111) en el tratamiento adicionado gallinaza de compostaje tradicional, exceptuando la variante coliformes totales del tratamiento adicionado gallinaza comercial, que se encontró concentraciones bacterianas superiores, con $4,43 \times 10^6$ UFC/g al día 0 y densidades similares al lapso de los 111 días.

Caso contrario ocurre en el tratamiento control, en donde en todo momento las densidades bacterianas fueron inferiores a los demás tratamientos en estudio, identificando que las aplicaciones de gallinaza influyen en la persistencia de las bacterias en los suelos o sustratos.

Tabla 5. Prueba de comparación por tratamiento (Bacterias)

Parámetros	SUSTRATO	SUSTRATO + GALLINAZA COMERCIAL	SUSTRATO + GALLINAZA COMPOSTAJE TRADICIONAL
	UFC/g	UFC/g	UFC/g
<i>E. coli</i> totales **	3,59 x 10 ¹ C	9,48 x 10 ¹ B	1,20 x 10 ⁵ A
<i>E. coli</i> resistentes a ácido nalidíxico **	2,47 x 10 ¹ B	1,20 x 10 ¹ B	4,38 x 10 ⁴ A
<i>E. coli</i> resistentes ** a sulfametoxazol	< 1 x 10 ² B	< 1 x 10 ² B	6,28 x 10 ⁴ A
Coliformes totales **	4,06 x 10 ¹ C	2,34 x 10 ⁵ B	3,98 x 10 ⁵ A
Coliformes resistentes a ácido nalidíxico **	1,00 x 10 ² B	9,55 x 10 ¹ B	5,05 x 10 ⁴ A
Coliformes resistentes ** a sulfametoxazol	8,51 x 10 ¹ C	1,02 x 10 ² B	6,51 x 10 ⁴ A
Heterótrofos totales **	1,02 x 10 ⁴ C	2,60 x 10 ⁶ B	7,97 x 10 ⁶ A
Heterótrofos resistentes a ácido nalidíxico **	2,57 x 10 ⁴ C	7,36 x 10 ⁴ B	4,20 x 10 ⁵ A
Heterótrofos resistentes a sulfametoxazol **	2,48 x 10 ⁴ C	9,59 x 10 ⁴ B	1,63 x 10 ⁶ A
P < 0,01 (99%) ** Altamente significativo			
P < 0,05 (95%) * significativo			

En la siguiente tabla se observa la comparación únicamente por tratamientos, donde existe una alta significancia entre los tratamientos en estudio. En el tratamiento adicionado gallinaza de compostaje tradicional existe una notoria diferencia de concentración de bacterias en comparación con el tratamiento adicionado gallinaza comercial y el tratamiento control, los cuales contienen densidades similares en todas las variantes en estudio, omitiendo las variantes coliformes totales y heterótrofos totales.

Tabla 6. Prueba de comparación de tratamiento por tiempo (DNA)

	Días	SUSTRATO	SUSTRATO + GALLINAZA COMERCIAL	SUSTRATO + GALLINAZA COMPOSTAJE TRADICIONAL
		CG/g	CG/g	CG/g
<i>bla_{TEM}</i> **	0	-C	6,61 x 10 ⁴ _B	1,39 x 10 ⁶ _A
	111	-C	1,20 x 10 ⁵ _B	4,86 x 10 ⁵ _A
<i>sull</i> **	0	1,15 x 10 ⁶ _{CD}	1,32 x 10 ⁷ _{BC}	3,11 x 10 ⁹ _A
	111	6,16 x 10 ⁴ _D	6,36 x 10 ⁶ _{BCD}	2,81 x 10 ⁸ _{AB}
<i>tetW</i> **	0	-D	4,91 x 10 ⁶ _{AB}	2,64 x 10 ⁷ _A
	111	-D	1,62 x 10 ⁵ _C	8,02 x 10 ⁵ _{BC}

CG: Copia genómica

P < 0,01 (99%) ** Altamente significativo

P < 0,05 (95%) * significativo

En la comparación de tratamiento por tiempo se puede decir que existe una influencia altamente significativa en relación a los tres genes en estudio. En sustrato no existió presencia de los genes: *bla_{TEM}* y *tetW*, a diferencia del gen *sull*. Por lo tanto, podemos observar que se encontró mayor densidad de ARGs en el tratamiento con gallinaza de compostaje tradicional.

Tabla 7. Prueba de comparación por tratamiento (DNA)

	SUSTRATO	SUSTRATO + GALLINAZA COMERCIAL	SUSTRATO + GALLINAZA COMPOSTAJE TRADICIONAL
	CG/g	CG/g	CG/g
<i>bla_{TEM}</i> **	-	8,92 x 10 ⁴ _B	8,22 x 10 ⁵ _A
<i>sull</i> **	2,67E x 10 ⁵ _C	9,15 x 10 ⁶ _B	9,35 x 10 ⁸ _A
<i>tetW</i> **	-	8,91 x 10 ⁵ _B	4,61 x 10 ⁶ _A

P < 0,01 (99%) ** Altamente significativo

P < 0,05 (95%) * significativo

En el caso de la comparación únicamente por tratamiento, se puede observar que existe una influencia altamente significativa entre los tres genes estudiados, observándose una mayor densidad de ARGs en el compostaje tradicional en comparación a los tratamientos con gallinaza comercial y control, para los tres genes en estudio.

3.2 Verificación de hipótesis

Al finalizar con el estudio, se acepta la hipótesis planteada. La adición de gallinazas (comercial y de compostaje tradicional) si influencia en las densidades y en la persistencia de bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en los suelos.

3.3 Discusión

La presente investigación se enfocó en la evaluación de la persistencia de bacterias y genes de resistencia antibióticos en un medio suplementado con gallinaza. Por medio

del análisis de resultados se ha determinado que, en cuanto a los dos tratamientos ejecutados y el control existe una considerable diferencia de acuerdo a las densidades de ARBs y ARGs. En el tratamiento control, se observa como la persistencia de bacterias heterótrofas es constante durante los 111 días de muestreo para todas las variantes analizadas (totales y resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico); en el caso de *E. coli* y coliformes, se observa una inactivación natural a los 11 días, casos similares ocurre con los tratamientos adicionados gallinaza comercial y de compostaje tradicional. Nuestros resultados están acorde a la investigación realizada por **Islam et al. (2004)** en la cual se detectó que los ARBs persisten entre 80 a 150 días aproximadamente; tomando en cuenta que, en los suelos expuestos la persistencia es menor y en los suelos en donde existe una cobertura vegetal la persistencia va a ser mayor para la inactivación natural de dichas bacterias frente a condiciones ambientales (calor, radiación solar, degradación).

En otros estudios también se observa la elevada persistencia de las enterobacterias, como por ejemplo en el estudio realizado por **Gagliardi y Karns (2002)**, en donde se inoculó directamente *E. coli* al suelo en ensayos de microcosmos, obteniendo como resultado una persistencia de 96 días en suelos cultivados con centeno; en donde los autores hacen énfasis en la existencia de competencia entre la microbiota indígena. Otro de los casos estudiados es la investigación realizada por **Sui et al. (2019)**, en donde detectaron una persistencia de ARBs durante 172 días, en suelos aplicados estiércol porcino, teniendo en cuenta que la fase activa de contaminación microbiana se da a los 82 días.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, se concuerda con lo detectado por las anteriores indagaciones; en donde se demuestra la elevada persistencia que presentan las bacterias entéricas en las condiciones ambientales presentes en ambientes de cultivo. Adicionalmente, nuestra investigación demuestra que las densidades de ARBs son significativamente más altas cuando se utilizan abonos de compostaje tradicional, debido a que la densidad bacteriana que se encuentra en esta matriz es abundante, ya que no han recibido un tratamiento térmico de inactivación que reduzca las elevadas poblaciones bacterianas presentes en las excretas (**Soobhany et al. 2017**,

Vázquez y Soto 2017). Adicionalmente, poseen una cantidad de agua elevada, la cual influencia la supervivencia microbiana (**Alegbeleye et al. 2018**). En el caso de los suelos en los que se aplica abonos comerciales, existe una persistencia bacteriana inferior debido a la baja densidad bacteriana que encontramos en él. Cabe recalcar que, la aplicación de ambos abonos influyen significativamente las densidades bacterianas de enterobacterias en el suelo.

En cuanto a los genes de resistencia, en los resultados obtenidos se pudo observar como la persistencia de dichos ARGs fue constante durante los 111 días de estudio. Al igual que en el caso de ARBs, los ARGs en suelos abonados con estiércol no compostado contienen una mayor densidad de ARGs en el suelo en comparación con los suelos en donde aplicamos abonos compostados. Podemos evidenciar que existió la presencia de los genes de resistencia a betalactámicos (*bla_{TEM}*), sulfonamidas (*sulI*) y tetraciclinas (*tetW*), los cuales están ampliamente presentes en residuos de origen fecal animal (**Tao et al. 2014, Calero-Cáceres et al. 2014**). No se detectaron densidades cuantificables de los genes de resistencia a quinolonas (*qnrS*), eritromicinas (*ermB*) ni del gen 16S rRNA, caso que si ocurrió en la investigación anteriormente mencionada con la persistencia de las eritromicinas (*ermB*). Estos resultados guardan relación con estudios realizados por investigadores chinos, en donde detectan una elevada persistencia y densidades de diferentes ARGs (*tetO*, *tetW*, *ermB* y *tnpA*) en abonos porcinos (**Pu et al. 2019**);

La persistencia del ARG *tetW* es significativa. En estudios relacionados se verifica esta observación. Como por ejemplo, en corrales abandonados por un largo periodo de tiempo, se encontró presencia de este gen, lo cual explica su elevada persistencia en el suelo, superando cualquier tipo de variación climática (**Li et al. 2019**). De la misma forma, en otro estudio se observa una elevada persistencia de ARGs que codifican resistencia a tetraciclinas (**Holvoet et al. 2013**). De igual manera ocurre en el estudio actual, en donde podemos observar cómo durante el transcurso de los 111 días, el gen se muestra estable en todos los tratamientos desarrollados con una reducción despreciable. Es usual el uso de los desechos producidos por los animales de la granja, los cuales después de procesarlos o ya sea en fresco son aplicados al suelo. En la

siguiente granja, tras varios años añadiendo estos abonos se detectó presencia de ARGs como, *tetL*, *tetM*, *tetW*, *ermA*, *ermB* y *ermC*. Tras dos años sin aplicar las excretas, tras el respectivo análisis del suelo se identificó la presencia únicamente de *tetL*, *tetM*, *tetW* y *ermC*. El gen *tetL* fue el gen más prevalente, mientras que *tetW* fue el más persistente (You et al. 2012). En el caso del estudio actual, no se detectó densidades cuantificables del ARG *ermB*, mientras que en el caso del *tetW*, se encontró presente en cada uno de los tratamientos desarrollados, con la diferencia de que, fue *sul1* el que prevaleció por encima de los demás genes de resistencia a antibióticos.

La presencia o ausencia de estos genes tiene que ver directamente con los mecanismos de resistencia presentes en la gallinaza utilizada. Los cuales, al parecer no contenían densidades detectables de genes de resistencia a quinolonas y a eritromicina. Sin embargo, la detección de los genes de resistencia a sulfonamida, tetraciclinas y betalactámicos son un indicador general de la persistencia de los mismos a lo largo del tiempo.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se evaluó las densidades de bacterias entéricas (*E. coli*, coliformes totales) y heterótrofas (totales y resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), en sustratos suplementados con gallinazas (comercial y de compostaje tradicional), durante 111 días, concluyendo que, el tratamiento adicionado gallinaza de compostaje tradicional, presentó las densidades más altas para los tres tipos de bacterias entéricas analizadas en sus tres variantes (resistentes a sulfametoxazol, ácido nalidíxico y sin antibiótico). En segundo lugar, encontramos el tratamiento más gallinaza comercial, en donde las densidades bacterianas fueron menores a las del tratamiento con gallinaza de compostaje tradicional, y finalmente tenemos el control, el cual presentó las densidades más bajas en comparación con los otros dos tratamientos. Cabe recalcar que, pese a que no se añadió ninguna clase de excreta al control, se presenciaron densidades bacterianas, lo cual nos indica que ningún suelo está exento de estas.
- Se evaluó el comportamiento de las densidades de genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica (*bla*_{TEM}, *sulI*, *qnrS*, *tetW*, *ermB* y del gen 16S rDNA), en sustratos suplementados con gallinazas (comercial y de compostaje tradicional), durante 111 días; determinando que, únicamente fueron detectados los genes de resistencia a betalactámicos (*bla*_{TEM}), sulfonamidas (*sulI*) y tetraciclinas (*tetW*). No se detectaron densidades cuantificables de los genes de resistencia a quinolonas (*qnrS*), eritromicinas (*ermB*) ni del gen 16S rRNA. En ambos tratamientos en estudio y en el control, el gen con mayor presencia fue *sulI*, seguido del gen *bla*_{TEM} y por último el gen *tetW*. En el tratamiento añadido gallinaza de compostaje tradicional presenciarnos las densidades más altas de todo el estudio; seguido por el tratamiento abonado con gallinaza comercial, cuyas densidades fueron menores; y finalmente tenemos al control, en el cual identificamos las densidades más bajas.

- Se valoró los niveles de inactivación de bacterias entéricas, heterótrofas (totales, resistentes) y genes de resistencia a antibióticos provenientes de la gallinaza de compostaje tradicional y gallinaza comercial durante el periodo de estudio, determinando niveles de inactivación no significativos, debido a que , únicamente se produce inactivación en el tratamiento testigo y el adicionado gallinaza comercial, para las bacterias *E. coli* y coliformes, resistente a sulfametoxazol y ácido nalidixico como podemos observar en los gráficos 2, 3, 6 y 7. En cuanto a las bacterias heterótrofas, no presentan inactivación en ninguno de los tratamientos, al igual que ocurre con el tratamiento suplementado con gallinaza de compostaje tradicional, el cual en ninguna de las variantes en estudio se puede observar inactivación natural.

4.2 Recomendaciones

- Es considerable que previo a la incorporación de un abono orgánico al suelo, este haya sufrido un previo proceso de compostaje, el cual nos ayudará a disminuir en gran porcentaje la presencia de bacterias y será provechoso para la microbiota del suelo. Es de importancia conocer el protocolo para la descomposición de abonos, el cual nos ayudara a obtener el mayor de los beneficios del mismo, y mejorando la seguridad alimentaria de la humanidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegbeleye, OO; Singleton, I; Sant'Ana, AS. 2018. Sources and contamination routes of microbial pathogens to fresh produce during field cultivation: A review. s.l., Academic Press, vol.73. p. 177-208 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.003>.
- Bueno, DJ; Soria, MC; Soria, MA; Procura, F; Rodriguez, FI; Godano, EI. 2016. Egg Production Systems and Salmonella in South America. s.l., Elsevier Inc. 87-110 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802582-6.00006-9>.
- Cabrera-Mireles, H; Murillo-Cuevas, FD; Adame-García, J; Fernández-Viveros, JA. 2019. Impact of land use on the edaphic meso and macrofauna in sugarcane and pasture (en línea). *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 22(1):33-43. Consultado 9 jun. 2020. Disponible en <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2654>.
- 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 and Technology* 48(13):7602-7611. DOI: <https://doi.org/10.1021/es501851s>.
- Chen, C; Pankow, CA; Oh, M; Heath, LS; Zhang, L; Du, P; Xia, K; Pruden, A. 2019. Effect of antibiotic use and composting on antibiotic resistance gene abundance and resistome risks of soils receiving manure-derived amendments. *Environment International* 128:233-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.04.043>.
- Chen, J; Yu, Z; Michel, FC; 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. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>.
- Chen, Q; An, X; Li, H; Su, J; Ma, Y; Zhu, YG. 2016. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil.

Environment International 92-93:1-10. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>.

Colomer-Lluch, M; Jofre, J; Muniesa, M. 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PloS one* 6(3):e17549. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017549>.

Cook, KL; Netthisinghe, AMP; Gilfillen, RA. 2014. Detection of pathogens, indicators, and antibiotic resistance genes after land application of poultry litter. *Journal of Environmental Quality* 43(5):1546-1558. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2013.10.0432>.

Cytryn, E. 2013. The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry* 63:18-23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.017>.

Davies, J; Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 74(3):417-33. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.

Eyhorn, F; Muller, A; Reganold, JP; Frison, E; Herren, HR; Luttikholt, L; Mueller, A; Sanders, J; Scialabba, NEH; Seufert, V; Smith, P. 2019. Sustainability in global agriculture driven by organic farming. s.l., Nature Publishing Group, vol.2. p. 253-255 DOI: <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0266-6>.

Fernández Terry, IM; Castellanos González, L; Fuente Gallardo, MJ. 2015. Indicadores de biodiversidad de la macrobiota del suelo en cuatro fincas en conversión hacia la producción agroecológica. (en línea). Biodiversity indicators of soil macrobiota at four farms in conversion toward the agroecological production. 19(1):1-12. Consultado 9 jun. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/310952395_Indicadores_de_biodiversidad_de_la_macrobiota_del_suelo_en_cuatro_fincas_en_conversion_hacia_la_produccion_agroecologica.

Gagliardi, J V.; Karns, JS. 2002. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in Soil and on plant roots (en línea). *Environmental Microbiology* 4(2):89-96. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00273.x>.

- Heuer, H; Schmitt, H; Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* 14(3):236-243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.04.009>.
- Holvoet, K; Sampers, I; Callens, B; Dewulf, J; Uyttendaele, M. 2013. Moderate prevalence of antimicrobial resistance in escherichia coli isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79(21):6677-6683. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01995-13>.
- International Organization for Standardization. 2014. ISO 9308-1:2014 - Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora. s.l., s.e.
- Islam, M; Doyle, MP; Phatak, SC; Millner, P; Jiang, X. 2004. Persistence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Journal of Food Protection* 67(7):1365-1370. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.7.1365>.
- Lachmayr, KL; Cavanaugh, CM; Kerkhof, LJ; DiRienzo, AG; Ford, TE. 2009. Quantifying nonspecific tem β -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1):203-211. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>.
- Li, N; Zhu, C; Liu, C; Zhang, X; Ding, J; Zandi, P; Li, H. 2019. The persistence of antimicrobial resistance and related environmental factors in abandoned and working swine feedlots. *Environmental Pollution* 255:113116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113116>.
- de Melo, CMR; Divilov, K; Schoolfield, B; Langdon, C. 2019. Selection of group and individual traits of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) on the West Coast, US. *Aquaculture* 512. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734389>.
- Muñoz Tarira, AJ; Tomalá Muñoz, RF. 2019. UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA TRABAJO DE TITULACIÓN PRESENTADO COMO REQUIIISTO PREVIO PARA OPTAR POR EL GRADO DE. s.l., s.e.

- Nadkarni, MA; Martin, FE; Jacques, NA; 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. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>.
- Nesme, J; Simonet, P. 2015. The soil resistome: A critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. s.l., Blackwell Publishing Ltd, vol.17. p. 913-930 DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>.
- Pérez-Valera, E; Kyselková, M; Ahmed, E; Sladeczek, FXJ; Goberna, M; Elhottová, D. 2019. Native soil microorganisms hinder the soil enrichment with antibiotic resistance genes following manure applications. *Scientific Reports* 9(1). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42734-5>.
- Perry, JA; Wright, GD. 2014. Forces shaping the antibiotic resistome. *BioEssays* 36(12):1179-1184. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.201400128>.
- Pruden, A; Arabi, M; Storteboom, HN. 2012. Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environmental science & technology* 46(21):11541-9. DOI: <https://doi.org/10.1021/es302657r>.
- Pruden, A; Pei, R; Storteboom, H; Carlson, KH. 2006. Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado †. *Environmental Science & Technology* 40(23):7445-7450. DOI: <https://doi.org/10.1021/es060413l>.
- Pu, C; Yu, Y; Diao, J; Gong, X; Li, J; Sun, Y. 2019. Exploring the persistence and spreading of antibiotic resistance from manure to biocompost, soils and vegetables. *Science of the Total Environment* 688:262-269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.081>.
- Rickie, S c; Gast, RK. 2017. Producing Safe Eggs. *Microbial Ecology of Salmonella*. s.l., s.e. 437 p.
- Schutzius, G; Nguyen, M; Navab-Daneshmand, T. 2019. Antibiotic resistance in fecal sludge and soil in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research* 26(33):34521-34530. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06081-1>.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-06537-5>.

Skaf, L; Buonocore, E; Dumontet, S; Capone, R; Franzese, PP. 2019. Food security and sustainable agriculture in Lebanon: An environmental accounting framework. *Journal of Cleaner Production* 209:1025-1032. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.301>.

Somorin, Y; Abram, F; Brennan, F; O'Byrne, C. 2016. The general stress response is conserved in long-term soil-persistent strains of *Escherichia Coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 82(15):4628-4640. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01175-16>.

Soobhany, N; Mohee, R; Garg, VK. 2017. Inactivation of bacterial pathogenic load in compost against vermicompost of organic solid waste aiming to achieve sanitation goals: A review. s.l., Elsevier Ltd, vol.64. p. 51-62 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.003>.

Sui, Q; Zhang, J; Chen, M; Wang, R; Wang, Y; Wei, Y. 2019. Fate of microbial pollutants and evolution of antibiotic resistance in three types of soil amended with swine slurry. *Environmental Pollution* 245:353-362. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.003>.

Tao, CW; Hsu, BM; Ji, WT; Hsu, TK; Kao, PM; Hsu, CP; Shen, SM; Shen, TY; Wan, TJ; Huang, YL. 2014. Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Science of the Total Environment* 496:116-121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.024>.

Udikovic-Kolic, N; Wichmann, F; Broderick, NA; Handelsman, J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(42):15202-7. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1409836111>.

United Nations. 2019. About the Sustainable Development Goals - United Nations Sustainable Development.

Urrea, J; Alkorta, I; Lanzén, A; Mijangos, I; Garbisu, C. 2019. The application of fresh and composted horse and chicken manure affects soil quality, microbial

- composition and antibiotic resistance. *Applied Soil Ecology* 135:73-84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.11.005>.
- Vázquez, MA; Soto, M. 2017. The efficiency of home composting programmes and compost quality. *Waste Management* 64:39-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.022>.
- Walsh, F; Ingenfeld, A; Zampiccolli, M; Hilber-Bodmer, M; Frey, JE; 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.011>.
- Wang, L; Wang, J; Wang, J; Zhu, L; Conkle, JL; Yang, R. 2020. Soil types influence the characteristic of antibiotic resistance genes in greenhouse soil with long-term manure application. *Journal of Hazardous Materials* 392:122334. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122334>.
- Xie, WY; Yang, XP; Li, Q; Wu, LH; Shen, QR; Zhao, FJ. 2016. Changes in antibiotic concentrations and antibiotic resistome during commercial composting of animal manures. *Environmental Pollution* 219:182-190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.044>.
- Xu, M; Stedtfeld, RD; Wang, F; Hashsham, SA; Song, Y; Chuang, Y; Fan, J; Li, H; Jiang, X; Tiedje, JM. 2019. Composting increased persistence of manure-borne antibiotic resistance genes in soils with different fertilization history. *Science of the Total Environment* 689:1172-1180. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.376>.
- You, Y; Hilpert, M; Ward, MJ. 2012. Detection of a common and persistent tet(L)-carrying plasmid in chicken-waste-impacted farm soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78(9):3203-3213. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.07763-11>.
- Zhang, YJ; Hu, HW; Chen, QL; Singh, BK; Yan, H; Chen, D; He, JZ. 2019. Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. *Environment International* 130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104912>.

ANEXOS

Anexo 1: Tabla resumen de los muestreos bacteriológicos del tratamiento solo sustrato, realizados durante los 120 días de estudio.

SUSTRATO								
TOTALES								
E. coli			Coliformes			Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd
0	1,30E+03	2,83E+02	0	1,70E+03	7,07E+02	0	1,32E+05	5,66E+03
1	7,91E+02	7,19E+02	1	1,25E+03	4,95E+02	1	1,20E+05	6,36E+03
3	4,86E+02	4,37E+02	3	1,02E+03	3,71E+02	3	1,05E+05	3,54E+03
8	2,00E+02	1,41E+02	8	3,50E+02	2,12E+02	8	7,20E+04	2,83E+03
11	0,00E+00	0,00E+00	11	0,00E+00	0,00E+00	11	3,35E+04	3,25E+03
22	0,00E+00	0,00E+00	22	0,00E+00	0,00E+00	22	1,75E+04	1,41E+03
29	0,00E+00	0,00E+00	29	0,00E+00	0,00E+00	29	1,32E+04	2,83E+02
36	0,00E+00	0,00E+00	36	0,00E+00	0,00E+00	36	1,02E+04	7,78E+02
43	0,00E+00	0,00E+00	43	0,00E+00	0,00E+00	43	7,90E+03	1,41E+02
57	0,00E+00	0,00E+00	57	0,00E+00	0,00E+00	57	5,55E+03	3,54E+02
71	0,00E+00	0,00E+00	71	0,00E+00	0,00E+00	71	3,30E+03	2,83E+02
86	0,00E+00	0,00E+00	86	0,00E+00	0,00E+00	86	1,95E+03	4,95E+02
101	0,00E+00	0,00E+00	101	0,00E+00	0,00E+00	101	1,20E+03	1,41E+02
116	0,00E+00	0,00E+00	116	0,00E+00	0,00E+00	116	8,00E+02	1,41E+02
SUSTRATO								
AC. NALIDIXICO								
E. coli			Coliformes			Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd
0	6,50E+02	3,54E+02	0	1,00E+04	0,00E+00	0	2,06E+05	7,94E+04
1	5,02E+02	2,10E+02	1	5,00E+03	7,07E+03	1	9,28E+04	1,29E+04
3	2,96E+02	2,02E+02	3	2,36E+03	2,09E+03	3	7,00E+04	2,83E+03
8	1,00E+02	0,00E+00	8	9,00E+02	2,83E+02	8	4,00E+04	7,07E+03
11	0,00E+00	0,00E+00	11	0,00E+00	0,00E+00	11	3,00E+04	2,83E+03
22	0,00E+00	0,00E+00	22	0,00E+00	0,00E+00	22	3,69E+04	7,07E+03
29	0,00E+00	0,00E+00	29	0,00E+00	0,00E+00	29	3,27E+04	2,69E+03
36	0,00E+00	0,00E+00	36	0,00E+00	0,00E+00	36	2,97E+04	6,08E+03
43	0,00E+00	0,00E+00	43	0,00E+00	0,00E+00	43	2,18E+04	2,55E+03
57	0,00E+00	0,00E+00	57	0,00E+00	0,00E+00	57	1,03E+04	3,54E+02
71	0,00E+00	0,00E+00	71	0,00E+00	0,00E+00	71	6,30E+03	2,83E+02
86	0,00E+00	0,00E+00	86	0,00E+00	0,00E+00	86	5,55E+03	3,54E+02
101	0,00E+00	0,00E+00	101	0,00E+00	0,00E+00	101	4,35E+03	2,12E+02
116	0,00E+00	0,00E+00	116	0,00E+00	0,00E+00	116	3,25E+03	4,95E+02

SUSTRATO								
SULFAMETOXAZOL								
E. coli			Coliformes			Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd
0	0,00E+00	0,00E+00	0	7,20E+03	7,07E+02	0	9,84E+04	6,26E+04
1	0,00E+00	0,00E+00	1	3,95E+03	4,59E+03	1	6,29E+04	9,54E+03
3	0,00E+00	0,00E+00	3	8,75E+02	6,27E+02	3	4,40E+04	2,83E+03
8	0,00E+00	0,00E+00	8	1,00E+02	0,00E+00	8	3,55E+04	4,95E+03
11	0,00E+00	0,00E+00	11	0,00E+00	0,00E+00	11	2,28E+04	4,24E+02
22	0,00E+00	0,00E+00	22	0,00E+00	0,00E+00	22	2,19E+04	4,24E+02
29	0,00E+00	0,00E+00	29	0,00E+00	0,00E+00	29	2,03E+04	8,49E+02
36	0,00E+00	0,00E+00	36	0,00E+00	0,00E+00	36	1,75E+04	1,13E+03
43	0,00E+00	0,00E+00	43	0,00E+00	0,00E+00	43	1,52E+04	1,41E+03
57	0,00E+00	0,00E+00	57	0,00E+00	0,00E+00	57	1,23E+04	1,91E+03
71	0,00E+00	0,00E+00	71	0,00E+00	0,00E+00	71	1,10E+04	3,54E+02
86	0,00E+00	0,00E+00	86	0,00E+00	0,00E+00	86	8,90E+03	9,90E+02
101	0,00E+00	0,00E+00	101	0,00E+00	0,00E+00	101	7,70E+03	8,49E+02
116	0,00E+00	0,00E+00	116	0,00E+00	0,00E+00	116	6,25E+03	7,78E+02

Anexo 2: Tabla resumen de los muestreos bacteriológicos del tratamiento adicionado gallinaza comercial, realizados durante los 120 días de estudio.

COMERCIAL								
TOTALES								
E. coli			Coliformes			Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd
0	9,00E+03	1,41E+02	0	4,25E+06	3,32E+05	0	8,80E+07	8,49E+05
1	5,40E+03	1,41E+02	1	3,46E+06	5,09E+05	1	7,08E+07	4,95E+05
3	3,05E+03	3,54E+02	3	3,03E+06	1,34E+05	3	7,20E+07	2,83E+06
8	1,35E+03	3,54E+02	8	2,71E+06	3,54E+04	8	4,70E+06	8,49E+05
11	7,00E+02	1,41E+02	11	2,02E+06	5,66E+04	11	2,05E+06	1,20E+05
22	3,50E+02	2,12E+02	22	1,39E+06	1,27E+05	22	1,19E+06	1,20E+05
29	5,00E+01	7,07E+01	29	9,45E+05	4,95E+04	29	9,90E+05	8,49E+04
36	0,00E+00	0,00E+00	36	7,95E+05	2,12E+04	36	9,10E+05	5,66E+04
43	0,00E+00	0,00E+00	43	6,75E+04	2,12E+03	43	6,15E+05	7,07E+03
57	0,00E+00	0,00E+00	57	3,09E+04	9,90E+02	57	1,60E+05	1,41E+03
71	0,00E+00	0,00E+00	71	2,90E+04	5,66E+02	71	1,48E+05	9,90E+03
86	0,00E+00	0,00E+00	86	2,12E+04	7,07E+02	86	1,21E+05	4,95E+03
101	0,00E+00	0,00E+00	101	1,87E+04	1,34E+03	101	9,45E+04	4,95E+03
116	0,00E+00	0,00E+00	116	1,30E+04	2,40E+03	116	7,75E+04	9,19E+03

COMERCIAL										
AC. NALIDIXICO										
E. coli				Coliformes				Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd		
0	1,50E+02	7,07E+01	0	9,20E+03	1,13E+03	0	7,70E+05	1,13E+05		
1	0,00E+00	0,00E+00	1	4,95E+03	9,19E+02	1	2,64E+05	1,20E+04		
3	0,00E+00	0,00E+00	3	1,40E+03	2,83E+02	3	8,65E+04	1,91E+04		
8	0,00E+00	0,00E+00	8	7,00E+02	1,41E+02	8	5,00E+04	1,56E+04		
11	0,00E+00	0,00E+00	11	1,00E+02	1,41E+02	11	3,20E+04	7,07E+03		
22	0,00E+00	0,00E+00	22	0,00E+00	0,00E+00	22	2,49E+04	9,19E+02		
29	0,00E+00	0,00E+00	29	0,00E+00	0,00E+00	29	1,67E+04	8,49E+02		
36	0,00E+00	0,00E+00	36	0,00E+00	0,00E+00	36	1,41E+04	7,78E+02		
43	0,00E+00	0,00E+00	43	0,00E+00	0,00E+00	43	1,47E+04	3,54E+02		
57	0,00E+00	0,00E+00	57	0,00E+00	0,00E+00	57	1,24E+04	1,84E+03		
71	0,00E+00	0,00E+00	71	0,00E+00	0,00E+00	71	1,11E+04	7,78E+02		
86	0,00E+00	0,00E+00	86	0,00E+00	0,00E+00	86	9,75E+03	1,48E+03		
101	0,00E+00	0,00E+00	101	0,00E+00	0,00E+00	101	8,75E+03	2,12E+02		
116	0,00E+00	0,00E+00	116	0,00E+00	0,00E+00	116	7,00E+03	2,83E+02		

COMERCIAL										
SULFAMETOXAZOL										
E. coli				Coliformes				Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd		
0	0,00E+00	0,00E+00	0	1,06E+04	3,54E+02	0	5,96E+06	6,09E+06		
1	0,00E+00	0,00E+00	1	6,35E+03	7,07E+01	1	2,96E+06	7,07E+04		
3	0,00E+00	0,00E+00	3	3,45E+03	2,12E+02	3	1,06E+06	9,19E+04		
8	0,00E+00	0,00E+00	8	1,40E+03	2,83E+02	8	9,60E+05	2,83E+04		
11	0,00E+00	0,00E+00	11	7,00E+02	1,41E+02	11	8,30E+05	4,24E+04		
22	0,00E+00	0,00E+00	22	3,50E+02	2,12E+02	22	7,25E+05	7,07E+03		
29	0,00E+00	0,00E+00	29	5,00E+01	7,07E+01	29	9,50E+04	7,07E+03		
36	0,00E+00	0,00E+00	36	0,00E+00	0,00E+00	36	9,25E+03	3,54E+02		
43	0,00E+00	0,00E+00	43	0,00E+00	0,00E+00	43	7,60E+03	5,66E+02		
57	0,00E+00	0,00E+00	57	0,00E+00	0,00E+00	57	5,90E+03	1,41E+02		
71	0,00E+00	0,00E+00	71	0,00E+00	0,00E+00	71	4,70E+03	7,07E+02		
86	0,00E+00	0,00E+00	86	0,00E+00	0,00E+00	86	3,65E+03	3,54E+02		
101	0,00E+00	0,00E+00	101	0,00E+00	0,00E+00	101	2,40E+03	4,24E+02		
116	0,00E+00	0,00E+00	116	0,00E+00	0,00E+00	116	1,55E+03	3,54E+02		

Anexo 3: Tabla resumen de los muestreos bacteriológicos del tratamiento adicionado gallinaza de compostaje tradicional, realizados durante los 120 días de estudio.

FRESCA										
TOTALES										
E. coli				Coliformes				Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd		
0	5,45E+05	3,45E+04	0	1,95E+06	1,47E+03	0	7,89E+08	2,30E+06		
1	4,90E+05	4,24E+04	1	1,28E+06	3,20E+03	1	7,98E+08	3,54E+06		
3	3,65E+05	6,36E+04	3	1,02E+06	7,07E+03	3	6,20E+08	8,49E+06		
8	3,00E+05	2,83E+04	8	8,60E+05	1,41E+04	8	2,61E+08	2,19E+06		
11	2,55E+05	7,07E+03	11	6,55E+05	7,07E+03	11	1,73E+08	2,62E+06		
22	1,96E+05	3,54E+03	22	5,83E+05	2,47E+04	22	1,30E+07	7,78E+05		
29	1,38E+05	6,36E+03	29	4,48E+05	2,83E+03	29	7,90E+06	2,55E+06		
36	1,00E+05	2,83E+03	36	3,92E+05	9,19E+03	36	2,17E+06	2,83E+05		
43	9,15E+04	3,54E+03	43	3,11E+05	3,54E+03	43	1,16E+06	1,34E+05		
57	7,85E+04	2,12E+03	57	2,61E+05	2,83E+03	57	1,67E+05	8,49E+03		
71	6,45E+04	7,07E+02	71	1,69E+05	5,66E+03	71	1,57E+05	2,12E+03		
86	5,40E+04	2,83E+03	86	1,49E+05	5,66E+03	86	1,25E+05	5,66E+03		
101	3,55E+04	4,95E+03	101	1,11E+05	8,49E+03	101	1,03E+05	7,78E+03		
116	2,66E+04	1,13E+03	116	8,20E+04	3,54E+02	116	8,05E+04	3,54E+03		

FRESCA										
AC. NALIDIXICO										
E. coli				Coliformes				Heterotrofos Totales		
Día	x	sd	Día	x	sd	Día	x	sd		
0	2,22E+05	9,90E+03	0	2,55E+05	7,07E+03	0	6,40E+06	2,30E+05		
1	2,09E+05	2,83E+03	1	2,35E+05	1,41E+03	1	4,85E+06	1,25E+05		
3	1,93E+05	1,13E+04	3	2,19E+05	9,90E+03	3	4,25E+06	3,54E+05		
8	1,68E+05	3,54E+03	8	1,86E+05	2,83E+03	8	3,40E+06	5,66E+05		
11	1,37E+05	2,19E+04	11	1,53E+05	2,12E+04	11	2,55E+06	5,94E+05		
22	9,55E+04	2,12E+03	22	1,07E+05	2,83E+03	22	1,91E+06	2,76E+05		
29	6,60E+04	2,83E+03	29	7,25E+04	6,36E+03	29	1,00E+06	1,41E+05		
36	3,95E+04	3,54E+03	36	4,50E+04	5,66E+03	36	3,45E+05	3,25E+04		
43	3,17E+04	6,43E+03	43	3,90E+04	6,43E+03	43	2,38E+05	1,06E+04		
57	2,70E+04	2,83E+03	57	3,24E+04	2,40E+03	57	1,59E+05	1,84E+04		
71	1,99E+04	2,62E+03	71	2,39E+04	2,55E+03	71	8,60E+04	1,41E+03		
86	1,67E+04	3,68E+03	86	1,97E+04	3,89E+03	86	5,65E+04	6,36E+03		
101	1,11E+04	9,90E+02	101	1,31E+04	1,34E+03	101	4,95E+04	4,95E+03		
116	8,70E+03	1,27E+03	116	1,01E+04	1,56E+03	116	2,75E+04	2,83E+02		

FRESCA										
SULFAMETOXAZOL										
E. coli				Coliformes				Heterotrofos Totales		
Día	x	sd		Día	x	sd		Día	x	sd
0	2,83E+05	3,54E+03		0	3,01E+05	2,12E+03		0	3,78E+08	1,25E+06
1	2,63E+05	9,90E+03		1	2,81E+05	1,06E+04		1	3,02E+08	2,35E+06
3	2,06E+05	2,83E+03		3	2,17E+05	4,24E+03		3	2,32E+08	3,82E+06
8	1,79E+05	8,49E+03		8	1,85E+05	9,90E+03		8	9,60E+07	7,07E+06
11	1,56E+05	4,95E+03		11	1,60E+05	3,54E+03		11	1,03E+07	2,83E+06
22	1,05E+05	1,41E+03		22	1,08E+05	4,95E+03		22	5,70E+06	9,90E+05
29	9,45E+04	7,07E+02		29	9,60E+04	2,83E+03		29	8,85E+05	4,95E+04
36	6,90E+04	7,07E+03		36	7,00E+04	8,49E+03		36	2,32E+05	7,07E+02
43	2,33E+04	2,90E+03		43	2,46E+04	3,11E+03		43	6,90E+04	5,66E+03
57	2,08E+04	1,70E+03		57	2,19E+04	1,77E+03		57	1,75E+04	1,48E+03
71	1,92E+04	1,41E+03		71	1,99E+04	1,56E+03		71	1,37E+04	2,97E+03
86	1,75E+04	1,70E+03		86	1,79E+04	1,56E+03		86	1,03E+04	9,19E+02
101	1,58E+04	1,56E+03		101	1,58E+04	1,56E+03		101	9,00E+03	1,27E+03
116	1,40E+04	1,56E+03		116	1,40E+04	1,56E+03		116	7,15E+03	4,95E+02

Anexo 4: Tabla resumen del ensayo de persistencia del gen 16S rDNA.

SISTR 16S rDNA											
				Ct<31	16s: $y = -0,3384x + 12,333$						
Día	Ct1	Ct2	Medi a Ct	Desv. Est	log num. copia s gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/m L
0	22,45	29,91	26,18	5,28	3,47	2,98E+03	3,31E+02	3,31E+04	2,90E+05	5,46	0,00
3	21,33	24,97	23,15	2,57	4,50	3,16E+04	3,51E+03	3,51E+05	1,34E+06	6,13	-0,67
11	16,85	29,98	23,42	9,28	4,41	2,57E+04	2,85E+03	2,85E+05	1,15E+06	6,06	-0,60
22	23,74	28,73	26,24	3,53	3,46	2,85E+03	3,17E+02	3,17E+04	1,26E+05	5,10	0,36
36	23,71	29,45	26,58	4,06	3,34	2,18E+03	2,42E+02	2,42E+04	9,57E+04	4,98	0,48
57	25,98	29,64	27,81	2,59	2,92	8,36E+02	9,29E+01	9,29E+03	3,66E+04	4,56	0,90
86	21,29	27,24	24,27	4,21	4,12	1,32E+04	1,47E+03	1,47E+05	5,74E+05	5,76	-0,30
111	23,10	28,81	25,96	4,04	3,55	3,55E+03	3,94E+02	3,94E+04	1,56E+05	5,19	0,27

COMERC
16S
rDNA

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Ct<31	16s: $y = -0,3384x + 12,333$					
					log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL
0	21,18	21,34	21,26	0,11	5,14	1,38E+05	1,53E+04	1,53E+06	1,47E+07	7,17	0,00
3	21,32	24,59	22,96	2,31	4,57	3,67E+04	4,08E+03	4,08E+05	1,61E+06	6,21	0,96
11	23,19	25,37	24,28	1,54	4,12	1,31E+04	1,45E+03	1,45E+05	5,74E+05	5,76	1,41
22	21,37	25,95	23,66	3,24	4,33	2,12E+04	2,36E+03	2,36E+05	9,28E+05	5,97	1,20
36	30,27	37,19	33,73	4,89	0,92	8,29E+00	9,22E-01	9,22E+01	3,69E+02	2,57	4,60
57	28,13	29,93	29,03	1,27	2,51	3,23E+02	3,59E+01	3,59E+03	1,41E+04	4,15	3,02
86	23,05	22,77	22,91	0,20	4,58	3,80E+04	4,23E+03	4,23E+05	1,67E+06	6,22	0,94
111	24,53	27,24	25,89	1,92	3,57	3,75E+03	4,16E+02	4,16E+04	4,08E+05	5,61	1,56

C. TRAD
16S
rDNA

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Ct<31	16s: $y = -0,3384x + 12,333$					
					log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL
0	24,00	20,45	22,23	2,51	4,81	6,49E+04	7,21E+03	7,21E+05	3,50E+06	6,54	0,00
3	20,90	18,74	19,82	1,53	5,63	4,23E+05	4,70E+04	4,70E+06	1,81E+07	7,26	-0,71
11	25,61	23,76	24,69	1,31	3,98	9,54E+03	1,06E+03	1,06E+05	4,12E+05	5,62	0,93
22	26,15	19,56	22,86	4,66	4,60	3,97E+04	4,41E+03	4,41E+05	1,74E+06	6,24	0,30
36	23,30	25,85	24,58	1,80	4,02	1,04E+04	1,15E+03	1,15E+05	4,57E+05	5,66	0,88
57	23,36	26,65	25,01	2,33	3,87	7,44E+03	8,26E+02	8,26E+04	3,21E+05	5,51	1,04
86	31,47	21,81	26,64	6,83	3,32	2,08E+03	2,31E+02	2,31E+04	9,21E+04	4,96	1,58
111	26,42	21,35	23,89	3,59	4,25	1,78E+04	1,98E+03	1,98E+05	1,72E+06	6,24	0,31

Anexo 5: Tabla resumen del ensayo de persistencia del gen *bla*_{TEM}.

SUSTR

					BACTERIANO		Ct<30,5	BLA _{TEM} : $y=-0,3114x + 12,476$				
					BACTERIANO		Ct<30,5	BLA _{TEM} : $y=-0,3114x + 12,476$				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est.	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	34,77	34,96	34,87	0,13	1,62	4,16E+01	4,62E+00	4,62E+02	4,05E+03	3,61	0,00	
3	31,31	31,83	31,57	0,37	2,65	4,42E+02	4,91E+01	4,91E+03	1,88E+04	4,27	-0,67	
11	33,32	33,43	33,38	0,08	2,08	1,21E+02	1,35E+01	1,35E+03	5,40E+03	3,73	-0,12	
22	31,97	28,90	30,44	2,17	3,00	9,97E+02	1,11E+02	1,11E+04	4,39E+04	4,64	-1,04	
36	31,60	31,79	31,70	0,13	2,61	4,04E+02	4,49E+01	4,49E+03	1,77E+04	4,25	-0,64	
57	31,77	32,42	32,10	0,46	2,48	3,03E+02	3,37E+01	3,37E+03	1,33E+04	4,12	-0,51	
86	31,35	31,17	31,26	0,13	2,74	5,52E+02	6,13E+01	6,13E+03	2,39E+04	4,38	-0,77	
111	31,14	32,19	31,67	0,74	2,62	4,13E+02	4,58E+01	4,58E+03	1,81E+04	4,26	-0,65	

COMER

					BACTERIANO		Ct<30,5	BLA _{TEM} : $y=-0,3114x + 12,476$				
					BACTERIANO		Ct<30,5	BLA _{TEM} : $y=-0,3114x + 12,476$				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est.	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	33,01	33,20	33,11	0,13	2,17	1,47E+02	1,63E+01	1,63E+03	1,57E+04	4,20	0,00	
3	33,25	31,59	32,42	1,17	2,38	2,40E+02	2,67E+01	2,67E+03	1,05E+04	4,02	0,17	
11	31,76	31,96	31,86	0,14	2,55	3,59E+02	3,99E+01	3,99E+03	1,58E+04	4,20	0,00	
22	32,92	32,55	32,74	0,26	2,28	1,92E+02	2,13E+01	2,13E+03	8,38E+03	3,92	0,27	
36	31,62	31,58	31,60	0,03	2,64	4,32E+02	4,80E+01	4,80E+03	1,92E+04	4,28	-0,09	
57	30,73	30,67	30,70	0,04	2,92	8,24E+02	9,16E+01	9,16E+03	3,61E+04	4,56	-0,36	
86	30,20	30,67	30,44	0,33	3,00	9,97E+02	1,11E+02	1,11E+04	4,38E+04	4,64	-0,45	
111	31,02	29,54	30,28	1,05	3,05	1,11E+03	1,24E+02	1,24E+04	1,21E+05	5,08	-0,89	

C. TRA

BACTERIANO					Ct<30,5	BLA _{TEM} : $y = -0,3114x + 12,476$						
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	26,20	25,59	25,90	0,43	4,41	2,58E+04	2,87E+03	2,87E+05	1,39E+06	6,14	0,00	
3	27,49	26,49	26,99	0,71	4,07	1,18E+04	1,31E+03	1,31E+05	5,06E+05	5,70	0,44	
11	28,94	27,04	27,99	1,34	3,76	5,75E+03	6,39E+02	6,39E+04	2,49E+05	5,40	0,75	
22	26,78	26,43	26,61	0,25	4,19	1,55E+04	1,73E+03	1,73E+05	6,79E+05	5,83	0,31	
36	27,44	27,11	27,28	0,23	3,98	9,61E+03	1,07E+03	1,07E+05	4,22E+05	5,63	0,52	
57	27,75	27,63	27,69	0,08	3,85	7,13E+03	7,93E+02	7,93E+04	3,08E+05	5,49	0,66	
86	27,74	27,61	27,68	0,09	3,86	7,21E+03	8,01E+02	8,01E+04	3,19E+05	5,50	0,64	
111	28,10	28,26	28,18	0,11	3,70	5,02E+03	5,58E+02	5,58E+04	4,85E+05	5,69	0,46	

Anexo 6: Tabla resumen del ensayo de persistencia del gen *sull*.

BACTERIANO					Ct<34,5	sul1 $y = -0,3203x + 12,884$						
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	31,20	30,77	30,99	0,30	2,96	9,11E+02	1,01E+02	1,01E+04	8,88E+04	4,95	0,00	
3	27,98	28,42	28,20	0,31	3,85	7,10E+03	7,89E+02	7,89E+04	3,02E+05	5,48	-0,53	
11	29,39	29,55	29,47	0,11	3,44	2,78E+03	3,09E+02	3,09E+04	1,24E+05	5,09	-0,15	
22	26,42	26,63	26,53	0,15	4,39	2,44E+04	2,72E+03	2,72E+05	1,08E+06	6,03	-1,08	
36	26,95	25,90	26,43	0,74	4,42	2,63E+04	2,92E+03	2,92E+05	1,16E+06	6,06	-1,11	
57	26,39	26,97	26,68	0,41	4,34	2,18E+04	2,42E+03	2,42E+05	9,53E+05	5,98	-1,03	
86	26,23	26,15	26,19	0,06	4,50	3,13E+04	3476,16586	3,48E+05	1,36E+06	6,13	-1,18	
111	27,09	33,71	30,40	4,68	3,15	1,40E+03	155,825127	1,56E+04	6,16E+04	4,79	0,16	

COM BACTERIANO

					Ct<34,5	sul1 y=-0,3203x + 12,884						
sul1												
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	24,81	23,85	24,33	0,68	5,09	1,23E+05	1,37E+04	1,37E+06	1,32E+07	7,12	0,00	
3	26,75	25,12	25,94	1,15	4,58	3,78E+04	4,20E+03	4,20E+05	1,65E+06	6,22	0,90	
11	25,20	24,66	24,93	0,38	4,90	7,92E+04	8,80E+03	8,80E+05	3,48E+06	6,54	0,58	
22	25,98	25,69	25,84	0,21	4,61	4,06E+04	4,52E+03	4,52E+05	1,78E+06	6,25	0,87	
36	25,31	26,28	25,80	0,69	4,62	4,19E+04	4,65E+03	4,65E+05	1,86E+06	6,27	0,85	
57	25,36	26,56	25,96	0,85	4,57	3,71E+04	4,12E+03	4,12E+05	1,62E+06	6,21	0,91	
86	24,98	24,63	24,81	0,25	4,94	8,69E+04	9,65E+03	9,65E+05	3,82E+06	6,58	0,54	
111	25,22	25,47	25,35	0,18	4,77	5,83E+04	6,48E+03	6,48E+05	6,36E+06	6,80	0,32	

C. TRA BACTERIANO

					Ct<34,5	sul1 y=-0,3203x + 12,884						
sul1												
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Des v. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	15,84	16,15	16,00	0,22	7,76	5,77E+07	6,41E+06	6,41E+08	3,11E+09	9,49	0,00	
3	20,30	19,32	19,81	0,69	6,54	3,46E+06	3,84E+05	3,84E+07	1,48E+08	8,17	1,32	
11	19,50	19,06	19,28	0,31	6,71	5,11E+06	5,68E+05	5,68E+07	2,21E+08	8,34	1,15	
22	19,11	18,95	19,03	0,11	6,79	6,15E+06	6,83E+05	6,83E+07	2,69E+08	8,43	1,06	
36	19,03	19,23	19,13	0,14	6,76	5,71E+06	6,34E+05	6,34E+07	2,51E+08	8,40	1,09	
57	18,95	19,70	19,33	0,53	6,69	4,95E+06	5,49E+05	5,49E+07	2,14E+08	8,33	1,16	
86	19,61	19,64	19,63	0,02	6,60	3,96E+06	4,40E+05	4,40E+07	1,75E+08	8,24	1,25	
111	19,98	20,11	20,05	0,09	6,46	2,91E+06	3,23E+05	3,23E+07	2,81E+08	8,45	1,04	

Anexo 7: Tabla resumen del ensayo de persistencia del gen *tetW*.

SUST

					BACTERIANO							
					Ct<30,5	tetW: $y = -0,2949x + 12,181$						
<i>tetW</i>												
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	35,55	33,47	34,51	1,47	2,00	1,01E+02	1,12E+01	1,12E+03	9,84E+03	3,99	0,00	
3	33,58	33,30	33,44	0,20	2,32	2,09E+02	2,32E+01	2,32E+03	8,89E+03	3,95	0,04	
11	34,48	34,52	34,50	0,03	2,01	1,02E+02	1,13E+01	1,13E+03	4,53E+03	3,66	0,34	
22	33,54	32,99	33,27	0,39	2,37	2,35E+02	2,61E+01	2,61E+03	1,04E+04	4,02	-0,02	
36	34,23	34,37	34,30	0,10	2,07	1,16E+02	1,29E+01	1,29E+03	5,11E+03	3,71	0,28	
57	34,65	35,27	34,96	0,44	1,87	7,44E+01	8,26E+00	8,26E+02	3,25E+03	3,51	0,48	
86	35,03	34,58	34,81	0,32	1,92	8,26E+01	9,18E+00	9,18E+02	3,59E+03	3,55	0,44	
111	34,48	38,51	36,50	2,85	1,42	2,62E+01	2,91E+00	2,91E+02	1,15E+03	3,06	0,93	

COM

					BACTERIANO							
					Ct<30,5	tetW: $y = -0,2949x + 12,181$						
<i>tetW</i>												
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	26,50	24,49	25,50	1,42	4,66	4,60E+04	5,11E+03	5,11E+05	4,91E+06	6,69	0,00	
3	30,64	30,15	30,40	0,35	3,22	1,65E+03	1,83E+02	1,83E+04	7,22E+04	4,86	1,83	
11	30,22	29,68	29,95	0,38	3,35	2,23E+03	2,48E+02	2,48E+04	9,80E+04	4,99	1,70	
22	31,23	30,89	31,06	0,24	3,02	1,05E+03	1,17E+02	1,17E+04	4,60E+04	4,66	2,03	
36	28,70	29,61	29,16	0,64	3,58	3,83E+03	4,26E+02	4,26E+04	1,70E+05	5,23	1,46	
57	31,27	31,57	31,42	0,21	2,92	8,23E+02	9,14E+01	9,14E+03	3,60E+04	4,56	2,14	
86	32,42	32,43	32,43	0,01	2,62	4,16E+02	4,62E+01	4,62E+03	1,83E+04	4,26	2,43	
111	29,70	31,40	30,55	1,20	3,17	1,49E+03	1,65E+02	1,65E+04	1,62E+05	5,21	1,48	

C. TRA

					Ct<30,5	tetW: $y = -0,2949x + 12,181$						
tetW					BACTERIANO							
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	log CG/mL	
0	21,65	22,37	22,01	0,51	5,69	4,90E+05	5,45E+04	5,45E+06	2,64E+07	7,42	0,00	
3	25,72	24,85	25,29	0,62	4,72	5,30E+04	5,89E+03	5,89E+05	2,27E+06	6,36	1,07	
11	24,85	23,97	24,41	0,62	4,98	9,60E+04	1,07E+04	1,07E+06	4,15E+06	6,62	0,80	
22	25,77	26,26	26,02	0,35	4,51	3,23E+04	3,59E+03	3,59E+05	1,41E+06	6,15	1,27	
36	26,84	26,83	26,84	0,01	4,27	1,85E+04	2,06E+03	2,06E+05	8,13E+05	5,91	1,51	
57	26,60	26,93	26,77	0,23	4,29	1,94E+04	2,16E+03	2,16E+05	8,39E+05	5,92	1,50	
86	26,87	27,39	27,13	0,37	4,18	1,51E+04	1,68E+03	1,68E+05	6,71E+05	5,83	1,60	
111	27,42	28,61	28,02	0,84	3,92	8,31E+03	9,23E+02	9,23E+04	8,02E+05	5,90	1,52	

Anexo 8: Tabla resumen del ensayo de persistencia del gen *tetW*.

SUST

qnrS					Ct<30	qnrS: $y = -0,3031x + 12,414$					
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	
0	36,64	36,98	36,81	0,24	1,26	1,81E+01	2,58E+00	2,58E+02	2,26E+03	3,35	
3	34,57	34,31	34,44	0,18	1,98	9,45E+01	1,35E+01	1,35E+03	5,17E+03	3,71	
11	33,58	35,50	34,54	1,36	1,94	8,81E+01	1,26E+01	1,26E+03	5,05E+03	3,70	
22	34,88	30,36	32,62	3,20	2,53	3,36E+02	4,81E+01	4,81E+03	1,91E+04	4,28	
36	33,10	32,96	33,03	0,10	2,40	2,53E+02	3,61E+01	3,61E+03	1,43E+04	4,15	
57	33,44	33,39	33,42	0,04	2,29	1,93E+02	2,76E+01	2,76E+03	1,09E+04	4,04	
86	33,21	32,98	33,10	0,16	2,38	2,41E+02	3,45E+01	3,45E+03	1,35E+04	4,13	
111	33,20	34,00	33,60	0,57	2,23	1,70E+02	2,43E+01	2,43E+03	9,59E+03	3,98	

COM

qnrS

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Ct<30	qnrS: $y = -0,3031x + 12,414$				
					log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	35,99	36,31	36,15	0,23	1,46	2,86E+01	4,09E+00	4,09E+02	3,93E+03	3,59
3	36,43	34,87	35,65	1,10	1,61	4,06E+01	5,80E+00	5,80E+02	2,28E+03	3,36
11	35,80	35,85	35,83	0,04	1,56	3,59E+01	5,13E+00	5,13E+02	2,03E+03	3,31
22	35,14	34,79	34,97	0,25	1,82	6,55E+01	9,35E+00	9,35E+02	3,68E+03	3,57
36	32,90	33,05	32,98	0,11	2,42	2,63E+02	3,75E+01	3,75E+03	1,50E+04	4,18
57	33,32	32,97	33,15	0,25	2,37	2,33E+02	3,33E+01	3,33E+03	1,31E+04	4,12
86	32,36	32,48	32,42	0,08	2,59	3,87E+02	5,53E+01	5,53E+03	2,18E+04	4,34
111	32,62	30,95	31,79	1,18	2,78	6,03E+02	8,61E+01	8,61E+03	8,44E+04	4,93

C. TRA

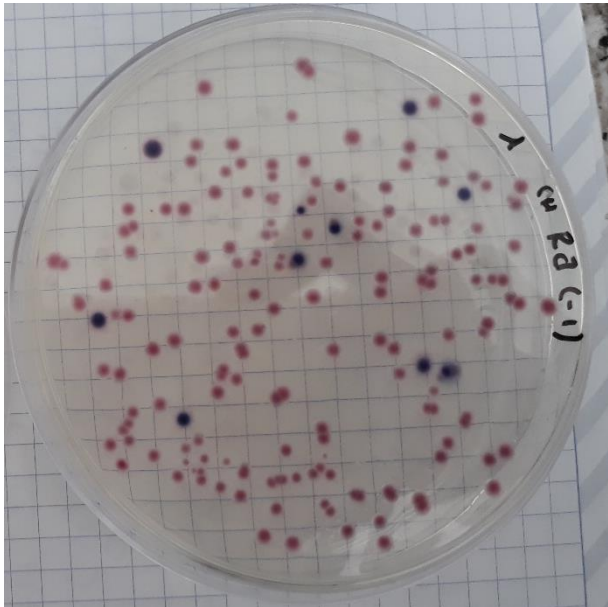
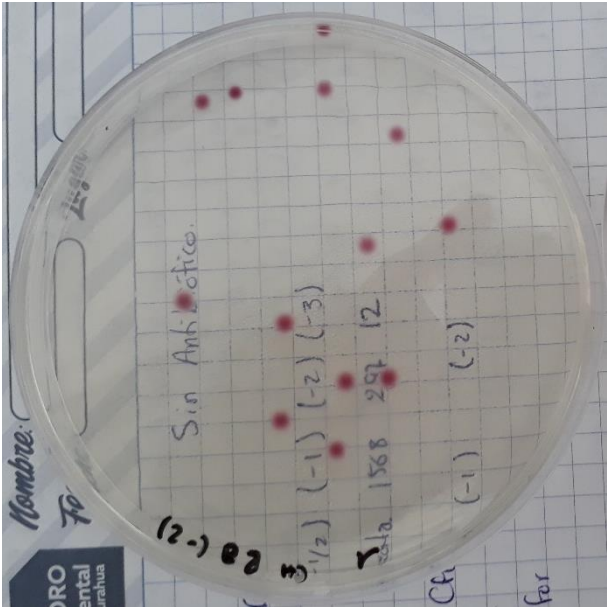
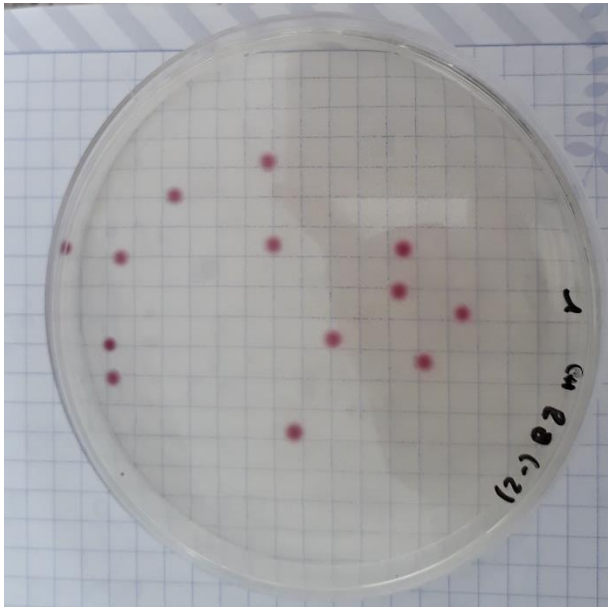
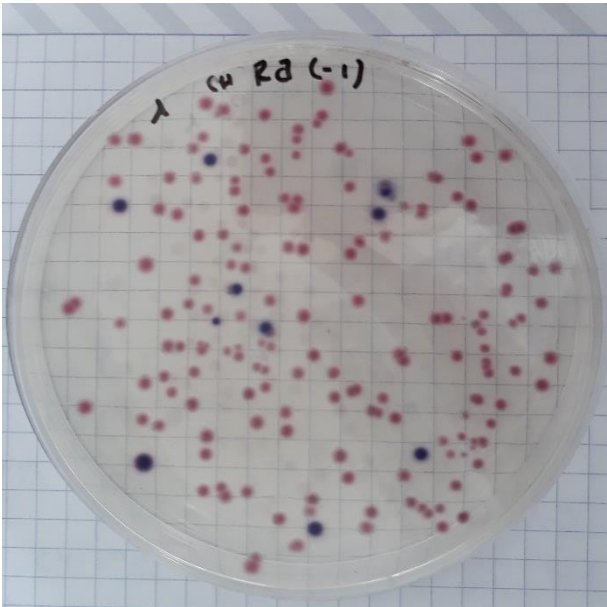
qnrS

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Ct<30	qnrS: $y = -0,3031x + 12,414$				
					log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	33,45	34,95	34,20	1,06	2,05	1,12E+02	1,60E+01	1,60E+03	7,74E+03	3,89
3	24,30	25,69	25,00	0,98	4,84	6,89E+04	9,84E+03	9,84E+05	3,80E+06	6,58
11	27,28	25,79	26,54	1,05	4,37	2,35E+04	3,36E+03	3,36E+05	1,31E+06	6,12
22	30,95	30,08	30,52	0,62	3,16	1,46E+03	2,09E+02	2,09E+04	8,22E+04	4,91
36	31,72	31,52	31,62	0,14	2,83	6,76E+02	9,66E+01	9,66E+03	3,82E+04	4,58
57	31,34	31,40	31,37	0,04	2,91	8,05E+02	1,15E+02	1,15E+04	4,47E+04	4,65
86	31,33	31,56	31,45	0,16	2,88	7,64E+02	1,09E+02	1,09E+04	4,35E+04	4,64
111	31,40	32,13	31,77	0,52	2,79	6,11E+02	8,73E+01	8,73E+03	7,59E+04	4,88

Anexo 8: Preparación de cajoneras con abonos en estudio.



Anexo 9: Conteo de *E. coli* y coliformes del día 43.



Anexo 10: Análisis estadístico de bacterias

ANOVA

Statistix 10.0
13:35:52

22/01/2020;

Split-plot AOV Table for Ecolitota

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0007	0.0003		
Tratam	2	44.4682	22.2341	19103.29	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0047	0.0012		
Tiempo	1	35.0843	35.0843	28192.72	0.0000
Tratam*Tiempo	2	5.4544	2.7272	2191.50	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0075	0.0012		
Total	17	85.0197			

Grand Mean 2.8706
CV(Rep*Tratam) 1.19
CV(Rep*Tratam*Tiempo) 1.23

Split-plot AOV Table for EcoliRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0016	0.0008		
Tratam	2	46.6706	23.3353	1756.74	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0531	0.0133		
Tiempo	1	20.2036	20.2036	2110.65	0.0000
Tratam*Tiempo	2	1.4252	0.7126	74.45	0.0001
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0574	0.0096		
Total	17	68.4116			

Grand Mean 2.3717
CV(Rep*Tratam) 4.86
CV(Rep*Tratam*Tiempo) 4.13

Split-plot AOV Table for EcoliRS

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0004	0.0002		
Tratam	2	92.0960	46.0480	224017.32	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0008	0.0002		
Tiempo	1	0.8493	0.8493	4131.92	0.0000
Tratam*Tiempo	2	1.6987	0.8493	4131.92	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0012	0.0002		
Total	17	94.6465			

Grand Mean 1.5994
CV(Rep*Tratam) 0.90
CV(Rep*Tratam*Tiempo) 0.90

Split-plot AOV Table for ColifTota

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0201	0.0100		
Tratam	2	60.2493	30.1247	23678.78	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0051	0.0013		
Tiempo	1	25.2998	25.2998	7919.92	0.0000
Tratam*Tiempo	2	2.5777	1.2888	403.46	0.0000

Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0192	0.0032
Total	17	88.1711	

Grand Mean	4.1922
CV(Rep*Tratam)	0.85
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	1.35

Split-plot AOV Table for ColifRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0024	0.0012		
Tratam	2	29.4499	14.7250	48190.76	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0012	0.0003		
Tiempo	1	43.8672	43.8672	56806.47	0.0000
Tratam*Tiempo	2	6.6232	3.3116	4288.43	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0046	0.0008		
Total	17	79.9486			

Grand Mean	2.8944
CV(Rep*Tratam)	0.60
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	0.96

Split-plot AOV Table for ColifRS

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0010	0.0005		
Tratam	2	32.3574	16.1787	52948.44	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0012	0.0003		
Tiempo	1	42.4428	42.4428	114025.31	0.0000
Tratam*Tiempo	2	6.8139	3.4070	9153.01	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0022	0.0004		
Total	17	81.6185			

Grand Mean	2.9178
CV(Rep*Tratam)	0.60
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	0.66

Split-plot AOV Table for HetTotale

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0008	0.0004		
Tratam	2	28.7652	14.3826	27541.16	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0021	0.0005		
Tiempo	1	42.9356	42.9356	48302.50	0.0000
Tratam*Tiempo	2	2.3520	1.1760	1323.01	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0053	0.0009		
Total	17	74.0610			

Grand Mean	5.7756
CV(Rep*Tratam)	0.40
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	0.52

Split-plot AOV Table for HetRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0030	0.0015		
Tratam	2	4.5065	2.2533	4035.70	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0022	0.0006		
Tiempo	1	19.2614	19.2614	25492.97	0.0000
Tratam*Tiempo	2	0.2427	0.1214	160.62	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0045	0.0008		

Total	17	24.0204
Grand Mean	4.9667	
CV(Rep*Tratam)	0.48	
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	0.55	

Split-plot AOV Table for HetRS

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.0006	0.0003		
Tratam	2	10.3147	5.1574	1485.32	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.0139	0.0035		
Tiempo	1	45.1567	45.1567	39457.29	0.0000
Tratam*Tiempo	2	9.6939	4.8470	4235.20	0.0000
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.0069	0.0011		
Total	17	65.1866			

Grand Mean	5.1961
CV(Rep*Tratam)	1.13
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	0.65

Prueba de Medias

Statistix 10.0
13:36:54

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Ecolitota for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	5.7367	A
3	1	4.4233	B
2	0	3.9533	C
1	0	3.1100	D
1	1	0.0000	E
2	1	0.0000	E

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.0288
Critical Q Value	7.981	Critical Value for Comparison	0.1625

Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.0283
Critical Q Value	9.178	Critical Value for Comparison	0.1839

Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Ecolitota for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	4.2667	A
1	1.4744	B

Alpha	0.01	Standard Error for Comparison	0.0166
Critical Q Value	5.225	Critical Value for Comparison	0.0614

All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Ecolitota for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	5.0800	A
2	1.9767	B
1	1.5550	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0197
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.1129
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRAN for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	5.3467	A
3	1	3.9367	B
1	0	2.7867	C
2	0	2.1600	D
1	1	0.0000	E
2	1	0.0000	E

Comparisons of means for the same level of Tratam
 Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0799
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.4508
 Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam
 Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0873
 Critical Q Value 9.420 Critical Value for Comparison 0.5814
 Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRAN for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	3.4311	A
1	1.3122	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0461
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.1704
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRAN for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	4.6417	A
1	1.3933	B
2	1.0800	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0665
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.3816
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRS for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	5.4500	A
3	1	4.1467	B
1	0	0.0000	C
1	1	0.0000	C
2	0	0.0000	C

2 1 0.0000 C

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0117
Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.0661
Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0117
Critical Q Value 9.219 Critical Value for Comparison 0.0763
Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRS for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	1.8167	A
1	1.3822	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 6.759E-03
Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0250
All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of EcoliRS for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	4.7983	A
1	0.0000	B
2	0.0000	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 8.278E-03
Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.0475
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifTota for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
2	0	6.6267	A
3	0	6.2900	B
3	1	4.9100	C
2	1	4.1100	D
1	0	3.2167	E
1	1	0.0000	F

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0461
Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.2604
Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0386
Critical Q Value 8.686 Critical Value for Comparison 0.2370
Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

All 6 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifTota for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	5.3778	A
1	3.0067	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0266
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0984
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifTota for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	5.6000	A
2	5.3683	B
1	1.6083	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0206
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.1181
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRAN for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	5.4067	A
1	0	4.0000	B
3	1	4.0000	B
2	0	3.9600	B
1	1	0.0000	C
2	1	0.0000	C

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0227
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.1280
 Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0190
 Critical Q Value 8.683 Critical Value for Comparison 0.1164
 Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRAN for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	4.4556	A
1	1.3333	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0131
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0484
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRAN for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	4.7033	A
1	2.0000	B
2	1.9800	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0101
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.0579
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRS for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
--------	--------	------	--------------------

3	0	5.4800	A
3	1	4.1467	B
2	0	4.0200	C
1	0	3.8600	D
1	1	0.0000	E
2	1	0.0000	E

Comparisons of means for the same level of Trtatam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0158
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.0889
 Error term used: Rep*Trtatam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Trtatam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0150
 Critical Q Value 9.097 Critical Value for Comparison 0.0967
 Error terms used: Rep*Trtatam and Rep*Trtatam*Tiempo

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRS for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	4.4533	A
1	1.3822	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 9.095E-03
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0336
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRS for Trtatam

Trtatam	Mean	Homogeneous Groups
3	4.8133	A
2	2.0100	B
1	1.9300	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0101
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.0579
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetTotale for Trtatam*Tiempo

Trtatam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	8.8967	A
2	0	7.9433	B
1	0	5.1200	C
3	1	4.9067	D
2	1	4.8867	D
1	1	2.9000	E

Comparisons of means for the same level of Trtatam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0243
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.1374
 Error term used: Rep*Trtatam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Trtatam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0217
 Critical Q Value 8.897 Critical Value for Comparison 0.1364
 Error terms used: Rep*Trtatam and Rep*Trtatam*Tiempo

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetTotale for Tiempo

Tiempo Mean Homogeneous Groups

0	7.3200	A
1	4.2311	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0141

Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0519

All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetTotale for Tratam**Tratam Mean Homogeneous Groups**

3	6.9017	A
2	6.4150	B
1	4.0100	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0132

Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.0757

All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRAN for Tratam*Tiempo**Tratam Tiempo Mean Homogeneous Groups**

3	0	6.8067	A
2	0	5.8867	B
1	0	5.3100	C
3	1	4.4400	D
2	1	3.8467	E
1	1	3.5100	F

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0224

Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.1267

Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0209

Critical Q Value 9.033 Critical Value for Comparison 0.1337

Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

All 6 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRAN for Tiempo**Tiempo Mean Homogeneous Groups**

0	6.0011	A
1	3.9322	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0130

Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0479

All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRAN for Tratam**Tratam Mean Homogeneous Groups**

3	5.6233	A
2	4.8667	B
1	4.4100	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0136

Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.0782

All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRS for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	8.5700	A
2	0	6.7767	B
1	0	4.9933	C
3	1	3.8533	D
1	1	3.7967	D
2	1	3.1867	E

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0276
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.1559
 Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0392
 Critical Q Value 9.843 Critical Value for Comparison 0.2730
 Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 5 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRS for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	6.7800	A
1	3.6122	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0159
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.0589
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HetRS for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	6.2117	A
2	4.9817	B
1	4.3950	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0340
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.1951
 All 3 means are significantly different from one another.

Descriptivos

Statistix 10.0
 13:37:48

22/01/2020;

Breakdown for Ecolitota

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	3.1100	0.0000	1.5550
	SD	0.0700	0.0000	1.7040
2	Mean	3.9533	0.0000	1.9767
	SD	5.774E-03	0.0000	2.1653

3	Mean	5.7367	4.4233	5.0800
	SD	0.0351	0.0153	0.7197
Total	Mean	4.2667	1.4744	2.8706
	SD	1.1621	2.2117	2.2363

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRAN

Tratam	Tiempo		Total	
	0	1		
1	Mean	2.7867	0.0000	1.3933
	SD	0.1762	0.0000	1.5304
2	Mean	2.1600	0.0000	1.0800
	SD	0.1510	0.0000	1.1869
3	Mean	5.3467	3.9367	4.6417
	SD	0.0153	0.0451	0.7729
Total	Mean	3.4311	1.3122	2.3717
	SD	1.4667	1.9685	2.0060

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRS

Tratam	Tiempo		Total	
	0	1		
1	Mean	0.0000	0.0000	0.0000
	SD	0.0000	0.0000	0.0000
2	Mean	0.0000	0.0000	0.0000
	SD	0.0000	0.0000	0.0000
3	Mean	5.4500	4.1467	4.7983
	SD	0.0000	0.0351	0.7142
Total	Mean	1.8167	1.3822	1.5994
	SD	2.7250	2.0734	2.3595

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for ColifTota

Tratam	Tiempo		Total	
	0	1		
1	Mean	3.2167	0.0000	1.6083
	SD	0.1305	0.0000	1.7638
2	Mean	6.6267	4.1100	5.3683
	SD	0.0252	0.0600	1.3790

3	Mean	6.2900	4.9100	5.6000
	SD	0.0300	0.0000	0.7561
Total	Mean	5.3778	3.0067	4.1922
	SD	1.6288	2.2816	2.2774

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRAN

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	4.0000	0.0000	2.0000
	SD	0.0000	0.0000	2.1909
2	Mean	3.9600	0.0000	1.9800
	SD	0.0400	0.0000	2.1691
3	Mean	5.4067	4.0000	4.7033
	SD	5.774E-03	0.0500	0.7711
Total	Mean	4.4556	1.3333	2.8944
	SD	0.7138	2.0002	2.1686

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRS

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	3.8600	0.0000	1.9300
	SD	0.0300	0.0000	2.1143
2	Mean	4.0200	0.0000	2.0100
	SD	0.0100	0.0000	2.2019
3	Mean	5.4800	4.1467	4.8133
	SD	0.0000	0.0351	0.7306
Total	Mean	4.4533	1.3822	2.9178
	SD	0.7733	2.0734	2.1911

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for HetTotale

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	5.1200	2.9000	4.0100
	SD	1.000E-02	0.0500	1.2164
2	Mean	7.9433	4.8867	6.4150
	SD	5.774E-03	0.0351	1.6744
3	Mean	8.8967	4.9067	6.9017

	SD	5.774E-03	0.0153	2.1854
Total	Mean	7.3200	4.2311	5.7756
	SD	1.7009	0.9989	2.0872

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for HetRAN

Tratam	Tiempo		Total	
	0	1		
1	Mean	5.3100	3.5100	4.4100
	SD	0.0100	0.0500	0.9864
2	Mean	5.8867	3.8467	4.8667
	SD	0.0451	0.0153	1.1178
3	Mean	6.8067	4.4400	5.6233
	SD	5.774E-03	0.0000	1.2963
Total	Mean	6.0011	3.9322	4.9667
	SD	0.6541	0.4086	1.1887

Cases Included 18 Missing Cases 0

Breakdown for HetRS

Tratam	Tiempo		Total	
	0	1		
1	Mean	4.9933	3.7967	4.3950
	SD	5.774E-03	0.0351	0.6558
2	Mean	6.7767	3.1867	4.9817
	SD	5.774E-03	0.0751	1.9669
3	Mean	8.5700	3.8533	6.2117
	SD	0.0557	0.0252	2.5837
Total	Mean	6.7800	3.6122	5.1961
	SD	1.5490	0.3230	1.9582

Cases Included 18 Missing Cases 0

Anexo 11: Análisis estadístico de genes

1. blaTEM

ANOVA

Statistix 10.0
12:19:15

22/01/2020;

Split-plot AOV Table for Gen

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.024	0.0121		
Tratam	2	120.842	60.4210	11732.22	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.021	0.0051		
Tiempo	1	0.019	0.0193	1.41	0.2792
Tratam*Tiempo	2	0.395	0.1974	14.44	0.0051
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.082	0.0137		
Total	17	121.383			

Grand Mean	3.6217
CV(Rep*Tratam)	1.98
CV(Rep*Tratam*Tiempo)	3.23

PRUEBA DE MEDIAS

Statistix 10.0
12:16:52

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	6.1433	A
3	1	5.6867	A
2	1	5.0800	B
2	0	4.8200	B
1	0	0.0000	C
1	1	0.0000	C

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0955

Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 0.5388

Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0792

Critical Q Value 8.658 Critical Value for Comparison 0.4850

Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	3.6544	A
1	3.5889	A

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0551

Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.2037
 There are no significant pairwise differences among the means.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	5.9150	A
2	4.9500	B
1	0.0000	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0414
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.2376
 All 3 means are significantly different from one another.

DESCRIPTIVOS

Statistix 10.0
 12:20:35

22/01/2020;

Breakdown for Gen

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	0.0000	0.0000	0.0000
	SD	0.0000	0.0000	0.0000
2	Mean	4.8200	5.0800	4.9500
	SD	0.0300	0.2300	0.2045
3	Mean	6.1433	5.6867	5.9150
	SD	0.0950	0.0252	0.2577
Total	Mean	3.6544	3.5889	3.6217
	SD	2.8005	2.7069	2.6721

Cases Included 18 Missing Cases 0

2. Sul1

ANOVA

Statistix 10.0
 12:23:34

22/01/2020;

Split-plot AOV Table for Gen

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.2914	0.1457		
Tratam	2	37.8928	18.9464	112.07	0.0003
Error Rep*Tratam	4	0.6762	0.1691		
Tiempo	1	3.4672	3.4672	15.43	0.0077
Tratam*Tiempo	2	0.7408	0.3704	1.65	0.2688
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	1.3480	0.2247		
Total	17	44.4166			

Grand Mean 7.1189
 CV(Rep*Tratam) 5.78
 CV(Rep*Tratam*Tiempo) 6.66

PRUEBA DE MEDIAS

Statistix 10.0
 12:24:23

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	9.4900	A
3	1	8.4500	AB
2	0	7.1200	BC
2	1	6.8000	BCD
1	0	6.0633	CD
1	1	4.7900	D

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.3870
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 2.1841
 Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.3623
 Critical Q Value 9.044 Critical Value for Comparison 2.3168
 Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tiempo

Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
0	7.5578	A
1	6.6800	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.2234
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.8256
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
3	8.9700	A
2	6.9600	B
1	5.4267	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.2374
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 1.3612
 All 3 means are significantly different from one another.

DESCRIPTIVOS

Statistix 10.0
 12:25:08

22/01/2020;

Breakdown for Gen

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	6.0633	4.7900	5.4267
	SD	0.0850	1.0600	0.9689
2	Mean	7.1200	6.8000	6.9600
	SD	0.1500	0.0400	0.2009
3	Mean	9.4900	8.4500	8.9700
	SD	0.0500	0.0200	0.5706
Total	Mean	7.5578	6.6800	7.1189
	SD	1.5223	1.6737	1.6164

Cases Included 18 Missing Cases 0

3. tetW

ANOVA

Statistix 10.0
12:25:42

22/01/2020;

Split-plot AOV Table for Gen

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	2	0.018	0.0088		
Tratam	2	160.623	80.3114	5075.86	0.0000
Error Rep*Tratam	4	0.063	0.0158		
Tiempo	1	4.500	4.5000	87.83	0.0001
Tratam*Tiempo	2	2.251	1.1256	21.97	0.0017
Error Rep*Tratam*Tiempo	6	0.307	0.0512		
Total	17	167.762			

Grand Mean 4.2044
CV(Rep*Tratam) 2.99
CV(Rep*Tratam*Tiempo) 5.38

PRUEBA DE MEDIAS

Statistix 10.0
12:26:00

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam*Tiempo

Tratam	Tiempo	Mean	Homogeneous Groups
3	0	7.4233	A
2	0	6.6900	AB
3	1	5.9033	BC

2	1	5.2100	C
1	0	0.0000	D
1	1	0.0000	D

Comparisons of means for the same level of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1848
 Critical Q Value 7.981 Critical Value for Comparison 1.0430
 Error term used: Rep*Tratam*Tiempo, 6 DF

Comparisons of means for different levels of Tratam

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1495
 Critical Q Value 8.565 Critical Value for Comparison 0.9055
 Error terms used: Rep*Tratam and Rep*Tratam*Tiempo

There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tiempo

Tiempo Mean Homogeneous Groups

0	4.7044	A
1	3.7044	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1067
 Critical Q Value 5.225 Critical Value for Comparison 0.3942
 All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Gen for Tratam

Tratam Mean Homogeneous Groups

3	6.6633	A
2	5.9500	B
1	0.0000	C

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.0726
 Critical Q Value 8.109 Critical Value for Comparison 0.4164
 All 3 means are significantly different from one another.

DESCRIPTIVOS

Statistix 10.0
 12:26:53

22/01/2020;

Breakdown for Gen

Tratam		Tiempo		Total
		0	1	
1	Mean	0.0000	0.0000	0.0000
	SD	0.0000	0.0000	0.0000
2	Mean	6.6900	5.2100	5.9500
	SD	0.3000	0.2500	0.8474
3	Mean	7.4233	5.9033	6.6633
	SD	0.1050	0.1750	0.8425
Total	Mean	4.7044	3.7044	4.2044
	SD	3.5462	2.7987	3.1414