

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



**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GALLINAZA DE COMPOSTAJE
TRADICIONAL Y COMERCIAL SOBRE LAS DENSIDADES DE
BACTERIAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN CULTIVO DE RÁBANO (*Raphanus sativus*) Y
LECHUGA (*Lactuca sativa*)”**

El estudio es parte del proyecto: “EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN AMBIENTAL 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 HCU 1752-CU-P-2019.

CRUZ MORALES CARLA MARISOL

TUTOR: Dr. William Ricardo Calero Cáceres PhD.

**CEVALLOS – ECUADOR
2020**

APROBACIÓN

“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GALLINAZA DE COMPOSTAJE TRADICIONAL Y COMERCIAL SOBRE LAS DENSIDADES DE BACTERIAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CULTIVO DE RÁBANO (*Raphanus sativus*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)”

REVISADO POR:



.....
Dr. William Calero Cáceres PhD.

TUTOR

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GALLINAZA DE COMPOSTAJE TRADICIONAL Y COMERCIAL SOBRE LAS DENSIDADES DE BACTERIAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CULTIVO DE RÁBANO (*Raphanus sativus*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)”**, como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Ingeniera Agrónoma, 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”.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GALLINAZA DE COMPOSTAJE TRADICIONAL Y COMERCIAL SOBRE LAS DENSIDADES DE BACTERIAS RESISTENTES Y GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CULTIVO DE RÁBANO (*Raphanus sativus*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)”

APROBADO POR:

FECHA:



.....

29 – 09 - 2020

Ing. Mg. Marco Pérez

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



.....

25 – 09 – 2020

Ing. Mg. Jorge Dobronski Arcos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



.....

26 – 09- 2020

Dr. Michel Leiva Mora

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

Primero a Dios, que me ha brindado el regalo de la vida y que siempre me ha bendecido poniendo a las personas correctas en mi camino, las cuales me han enseñado y he aprendido mucho de ellas.

A mis padres que a pesar de las adversidades que nos ha dado la vida, no han dejado de apoyarme en mis proyectos, solo Dios y ellos saben el sacrificio que han hecho y pasado para que a mí no me falte nada, este logro es suyo también, los amo mucho.

A mi hermana menor Anahí Cruz, te lo dedico con la finalidad de que sea tu motivación en tus metas, te lo he dicho y hoy te lo demuestro, todo es posible y más aún cuando te lo propones y perseveras, tienes mi apoyo incondicional porque yo creo en tu capacidad, sé que llegarás muy lejos.

A mis ángeles que sé que jamás me han abandonado ni me abandonarán, mis abuelitos paternos, Angélica Pérez y Noe Cruz, espero estén orgullosos de mí, gracias por quererme como ustedes lo hacían, siempre los llevaré en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Me faltaría vida para agradecer a mis padres, gracias por creer en mí, Anahí, gracias por ser mi cómplice y sobre todo por tu paciencia al ayudarme a tomar datos de este proyecto.

A mi prima, Wilma Villacís, que desde pequeña me ayudado mucho en mis estudios y siempre fue mi motivación, gracias por todo lo que ha hecho por mí y mi familia.

A Rosita, por ser esa persona incondicional y mejor amiga, gracias por no abandonarme pese a lo difícil que puedo llegar a ser, gracias por ser una hermana y esa luz en mis momentos más oscuros.

A los docentes de la carrera de Ingeniería Agronómica, especialmente al Ing. Eduardo Cruz, Ing. Jorge Dobronsky, Ing. Santiago Espinosa, Dr. Carlitos Vásquez, Ing. Rita Santana, gracias por sus conocimientos impartidos en el aula, gracias por demostrar siempre que se puede ser amigos sin interés alguno, por favor no se olviden de mí, que yo no los olvidaré, Dios les bendiga siempre.

Quiero extender un sincero agradecimiento a mis revisores del proyecto de tesis, Ing. Jorge Dobronsky, Ing. Eduardo Cruz (+) y Dr. Michel Leiva, infinitas gracias por su paciencia y tiempo.

A mi compañero de universidad, de clase, de equipo, de VIDA, David Bohórquez, gracias infinitas por no soltar mi mano, hemos culminado algo que en algún momento a punto de rendirnos creíamos imposible, gracias por ser mi soporte incondicional, juntos somos un gran equipo y juntos llegaremos lejos. TE AMO.

Y por último, quiero agradecer a **UTA RAM One Health**, liderado por el Dr. William Calero, Dios le pague por recibirnos con los brazos abiertos en su laboratorio, gracias por todo el conocimiento transmitido, sobre todo por su ayuda y guía, este proyecto no fue algo fácil para nosotros, no fue algo de un mes, fueron meses y horas de trabajo, altas y bajas que me han hecho crecer como persona y como profesional, me llevo gratos recuerdos. Le deseo muchos éxitos, se los merece y sin duda alguna, usted dejará huella en la Facultad de Ingeniería en Alimentos así como lo hizo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

1. CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	12
1.1. Antecedentes investigativos	12
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo General	16
1.2.2. Objetivos Específicos.....	16
1.3. Hipótesis.....	16
2. CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	17
2.1. Equipos y Materiales.....	17
2.1.1. Equipos.....	17
2.1.2. Materiales y reactivos.....	17
2.2. Métodos y Protocolos.....	19
2.2.1. Microbiología.....	19
3. CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1. Resultados	26
3.1.1. Microorganismos aerobios	26
3.1.2. Perfiles de resistencia	30
3.1.3. Conjugación	33
3.1.4. Cuantificación de ARGs en vegetales.....	33
3.2. Discusión.....	36
3.3. Verificación de la hipótesis	39
4. CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
4.1. Conclusiones	40
4.2. Recomendaciones.....	41
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
6. ANEXOS	52
6.1. ANEXO A.....	52
6.2. ANEXO B.....	61
6.3. ANEXO C	65
6.4. ANEXO D.....	89

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Tabla 1. Protocolo de qPCR con sondas TaqMan.....	24
Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de primers y sondas de qPCR	25
Tabla 3. Microorganismos aerobios (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), coliformes (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) y <i>E. coli</i> (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) en rábano.....	27
Tabla 4. Microorganismos aerobios (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), coliformes (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) y <i>E. coli</i> (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) en lechuga.	28
Tabla 5. Media del diámetro del halo de inhibición de 6 cepas de <i>E. coli</i> aislados de rábanos y lechugas, usando 18 antibióticos.....	31
Tabla 6. Lechugas aplicadas “Gallinaza de Compostaje Tradicional”	61
Tabla 7. Lechugas aplicadas “Gallinaza Comercial”	62
Tabla 8. Lechugas en “Sustrato” (TESTIGO).....	62
Tabla 9. Rábanos aplicados “Gallinaza de Compostaje Tradicional”	63
Tabla 10. Rábanos aplicados “Gallinaza Comercial”	63
Tabla 11. Rábanos en “Sustrato” (TESTIGO)	64
Tabla 12. Análisis N – P – K de rábanos.....	89
Tabla 13. Análisis N – P – K de lechugas	89
Tabla 14. Información del parámetro analizado.....	89
Gráfico 1. Perfiles de resistencia de 6 cepas de <i>E. coli</i> aisladas de rábanos y lechugas, usando 18 antibióticos.	32
Gráfico 2. Boxplots gen <i>sul1</i> en rábano	33
Gráfico 3. Boxplots del gen <i>sul1</i> en lechuga.....	34
Gráfico 4. Boxplots del gen <i>bla_{TEM}</i> en rábano.....	35
Gráfico 5. Boxplots del gen <i>bla_{TEM}</i> en lechuga.....	36

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: Cosecha de rábano	52
Fotografía 2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: Cosecha de lechuga	52
Fotografía 3. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato y aplicados gallinaza de compostaje tradicional	53
Fotografía 4. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato y aplicados gallinaza comercial	53
Fotografía 5. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato (testigo)	54
Fotografía 6. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Lechugas cultivadas en sustrato y aplicadas gallinaza de compostaje tradicional, comercial y sustrato. (De manera ascendente)	54
Fotografía 7. LAVADO DE MUESTRAS: Para análisis microbiológico, técnicas moleculares	55
Fotografía 8. LAVADO DE MUESTRAS: Para análisis N-P-K	55
Fotografía 9. MICROBIOLOGÍA: Preparación de diluciones seriales para realizar cuantificación de microorganismos aerobios en lechuga	56
Fotografía 10. MICROBIOLOGÍA: Preparación de diluciones seriales para realizar cuantificación de microorganismos aerobios en lechuga	56
Fotografía 11. MICROBIOLOGÍA: Criopreservación de bacterias aerobias (E. Coli) resistentes a antibióticos	57
Fotografía 12. MICROBIOLOGÍA: E. coli en agar MacConkey	57
Fotografía 13. MICROBIOLOGÍA: E. coli (colonia de color morado) y coliformes (colonias de color rojo) en agar Chromocult.	58
Fotografía 14. MICROBIOLOGÍA: Aerobios en agar LB	58
Fotografía 15. MICROBIOLOGÍA: Perfiles de resistencia	59
Fotografía 16. MICROBIOLOGÍA: E.coli β – lactamasas con antibióticos (FEP30),(CAZ30), (CRO30) y (AMC30).	59
Fotografía 17. CONJUGACIÓN: Antibiograma en placas Mueller – Hinton	60
Fotografía 18. TÉCNICAS MOLECULARES: Recepción de muestras de DNA, extraídas con el kit para la cuantificación de ARGs.	60

RESUMEN

Los residuos de las explotaciones avícolas son utilizados como una fuente de nutrientes y de materia orgánica en los suelos agrícolas, en especial en los sistemas de agricultura orgánica. Sin embargo, estos materiales pueden causar efectos adversos sobre las condiciones generales del suelo, ya que contienen altas densidades de bacterias entéricas potencialmente patógenas; como por ejemplo bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y sus correspondientes genes de resistencia a antibióticos (ARGs). La utilización de estos materiales puede representar una probable vía de diseminación de microorganismos patógenos y sus determinantes a través de la cadena alimentaria. En esta investigación que forma parte del proyecto "EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN AMBIENTAL DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR MEDIO DEL ESTIÉRCOL DE GALLINA" (HCU 1752-CU-P-2019), se realizó la evaluación del efecto de la adición de gallinaza de compostaje tradicional y comercial sobre las densidades de ARBs y ARGs en vegetales cosechados con estos materiales. Adicionalmente, se evaluaron los mecanismos de virulencia y resistencia de los aislamientos de *Escherichia coli* detectados. Los resultados sugieren que la gallinaza de compostaje tradicional influencia en mayor grado la diseminación de ARBs y ARGs en relación a la gallinaza comercial. Los aislados de *E. coli* presentaron un perfil de multirresistencia a antibióticos, destacando que los mecanismos de resistencia antibiótica de estas bacterias se encontraron codificados en cromosomas y no en plásmidos. Por otro lado, se usó la técnica de qPCR, para la detección de ARGs, los cuales mostraron niveles muy altos de detección para los genes: *sull* y *bla_{TEM}* y bajos niveles de detección en genes como: *qnrS*, *tetW*, *ermB* y 16S rADN. Llegando a la conclusión que la diseminación de ARBs y ARGs a partir de gallinazas de compostaje tradicional y comercial hacia los alimentos es probable, representando ésta una potencial vía de diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos a través de los alimentos.

SUMMARY

Poultry manure is traditionally used as a good source of nutrients and organic matter in agricultural soils, especially in organic-farming systems. However, these materials can cause adverse effects on general soil conditions, since they contain high densities of potentially pathogenic enteric bacteria; such as antibiotic resistant bacteria (ARBs) and their corresponding antibiotic resistance genes (ARGs). The use of these materials may represent a probable route of dissemination of pathogenic microorganisms and their determinants through the food chain. This thesis is part of the project "EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN AMBIENTAL DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR MEDIO DEL ESTIÉRCOL DE GALLINA" (HCU 1752-CU-P-2019). The aim of this thesis is the evaluation of the effect of the addition of traditional and commercial composting on the densities of ARBs and ARGs in vegetables (lettuce and radish). The virulence and resistance mechanisms of the detected *E. coli* isolates were evaluated. The results suggest that traditional composting chicken manure influences to a greater extent the spread of ARBs and ARGs in relation to commercial chicken manure. The *E. coli* isolates presented an antibiotic multiresistance profile. The transconjugation experiments suggest the mechanisms of antibiotic resistance of these bacteria were found encoded in chromosomes and not in plasmids. On the other hand, the qPCR technique was used to detect ARGs, which showed very high levels of detection for *sulI* and *bla*_{TEM} and low levels of detection to *qnrS*, *tetW*, *ermB* and 16S rDNA. The dissemination of ARBs and ARGs from traditional and commercial poultry manure to food is plausible, representing this a potential route of dissemination of antibiotic resistance determinants through the food chain

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

La agricultura orgánica representa una alternativa a los métodos de agricultura convencional, ya que está enfocada en la sustentabilidad, sostenibilidad y la conservación del ambiente. (**González et al. 2017**). A nivel general, los sistemas de agricultura orgánica reemplazan el uso de fertilizantes inorgánicos por abonos de origen animal (**Ren et al. 2019**). La adición de residuos animales suministra la demanda de nutrientes para las plantas y mejora la calidad del suelo por poseer nutrientes esenciales para el desarrollo vegetal (**Hossain 2018**). Por ejemplo, en el cultivo de remolacha *Beta vulgaris*, al usar excremento de aves de corral se observaron efectos positivos en la rizosfera y altura de la planta (**Pyakurel et al. 2018**). Al igual que en el cultivo de rábano (*Raphanus sativus*) y lechuga (*Lactuca sativa*), se obtuvo altos rendimientos y una mejora de las propiedades químicas y físicas del suelo al ser aplicado (**Adekiya et al. 2019**). En el cultivo de lechuga, el uso de este estiércol es muy acogido por los agricultores, por su bajo costo y su elevado contenido de nitrógeno (**Yaduma et al. 2018**). En adición a estas ventajas, su uso en comparación de los productos químicos se favorece, considerando el costo elevado de los productos sintéticos y que favorece a la degradación del suelo (**Dixit et al. 2018**).

Históricamente, los residuos de la industria productiva animal han sido utilizados como abonos en suelo; considerando su elevado contenido de elementos químicos necesarios para la nutrición vegetal, su costo y facilidad de uso (**Marti et al. 2014**). Sin embargo, los mismos contienen elevadas densidades de bacterias entéricas, entre ellas bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y sus correspondientes genes de resistencia a antibióticos (ARGs), por lo que son catalogados como potenciales reservorios de estos contaminantes (**Cheng et al. 2016, Cook et al. 2014**); aumentando

la probabilidad de transferirse dentro de la cadena alimentaria a través del consumo de vegetales cultivados en suelos que han recibido enmiendas de estiércol (**Sun et al. 2018**).

Actualmente, el uso de antibióticos en el sector productivo utilizados como terapéuticos, mejoradores de eficiencia de pienso o promotores de crecimiento, ha contribuido significativamente a la aceleración del ritmo evolutivo bacteriano (**Laxminarayan et al. 2013**). Se estima que más del 80% de la producción mundial de antibióticos es utilizada en animales, cuya utilización muchas veces no cuenta con adecuada supervisión profesional (**Wieland et al. 2018**). Por lo tanto, su presencia en los nichos ecológicos animales tiende a modificar la estructura de su microbioma, favoreciendo a las poblaciones bacterianas resistentes, en especial a las del tracto gastrointestinal, el cual es un hábitat natural de microorganismos potencialmente patógenos (**Zhu et al. 2013, van den Bogaard y Stobberingh 1999**).

Existe una vasta evidencia que liga el uso de estiércol de animales en sistemas agrícolas con la diseminación de antibióticos, bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en campos de cultivo y alimentos (**Chung et al. 2017, Cornejo et al. 2018**). Estos contaminantes pueden ser absorbidos por la raíz de las plantas o estar presentes a nivel superficial (**Wang et al. 2018**). Por ejemplo, en cultivos de lechuga que recibieron enmiendas de estiércol de aves de corral, se detectaron altos niveles de ARGs en la rizosfera, litosfera y el endófito de la raíz (**Zhang et al. 2019**). La aplicación de estas prácticas puede representar un riesgo potencial de integración de contaminantes biológicos y químicos dentro de la cadena alimentaria (**Sarmah et al. 2006, Tien et al. 2017, Heuer et al. 2011**). Por lo cual, el uso de ciertos estiércoles de origen animal en cultivos puede representar una de las causas en el incremento de la resistencia antibiótica en seres humanos y animales (**Wang et al. 2018**).

A nivel mundial se han realizado una variedad de investigaciones que correlacionan las densidades bacterianas en alimentos provenientes de cultivos que han utilizado excremento de animales. Por ejemplo, en cultivos de rábano y lechuga cultivados a partir de suelos con estiércol bovino, los

niveles de ARBs y de ARGs se incrementan considerablemente (**Guron et al. 2019**). *Escherichia coli* es el mayor responsable de brotes transmitidos a productos que son consumidos en fresco y que su suelo ha recibido enmiendas de estiércol (**Luna-Guevara et al. 2019**). Otra investigación demostró que los vegetales provenientes de suelos que han recibido estiércol crudo presentaban densidades elevadas de ARBs (**Tien et al. 2017**). Y mayor ARGs en suelos donde es aplicado estiércol crudo en comparación de suelos donde es aplicado estiércol compostado (**Murray et al. 2019**).

De igual manera, el estiércol fresco de pollo posee altas concentraciones de ARGs en comparación del estiércol fresco de caballo (**Urrea et al. 2019**). A pesar que las ARBs y ARGs presentan una elevada persistencia frente a tratamientos de compostaje termofílico, motivo por el cual este tratamiento no representa una garantía de eliminación total de contaminantes biológicos (**Xie et al. 2016**). No se descarta como una solución a los tratamientos de estiércol antes de ser aplicados al suelo para disminuir la presencia de ARGs (**Luna-Guevara et al. 2019**).

La transferencia de *E. coli* al sistema de las plantas es posible, sea por la aplicación de estiércol o por medio del agua de riego (**Habteselassie et al. 2010**). En Estados Unidos, en una granja se detectó un brote de *E. coli* O157: H7; se vinculó como vector a los cultivos de lechuga, donde 5 de 10 muestras dieron positivo a *E. coli* O157: H7 (**CDC 2018**). Un estudio confirma que la carga bacteriana en verduras de hoja es disminuida pero no en su totalidad cuando se lava con agua potable (**Uhlig et al. 2017**). Lo que resulta perjudicial ya que las condiciones comerciales de productos frescos (**Hutchison et al. 2017**), no nos garantiza el control de *E. coli* de manera segura (**Jung et al. 2014, Hutchison et al. 2017**). Es necesario reducir el uso de antibióticos así como las prácticas que ayudan a la dispersión de ARBs o ARGs. (**Tiedje et al. 2019**)

Una de las causas de la variación genotípica en bacterias es la capacidad de transferir horizontalmente sus genes (HGT: del inglés *horizontal gene transfer*) (Nielsen *et al.* 2019), lo que ha ocasionado que las bacterias sean capaces de evolucionar permitiendo que mejoren su adaptabilidad, aseguren su sobrevivencia y promuevan la propagación de genes a distintas poblaciones bacterianas (Carvalho *et al.* 2019). Los ARGs se transportan a las bacterias por plásmidos mediante el proceso de conjugación (Povolo y Ackermann 2019), esto ocurre dentro del tracto gastrointestinal del animal debido a las elevadas densidades bacterianas presentes (Dungan *et al.* 2019), donde pueden ocurrir estos eventos con una elevada probabilidad (Villa *et al.* 2019). La transferencia de genes de resistencia por conjugación en cultivos que poseían *E. coli* se identificó en la mayoría de 43 estudios en una revisión sistemática (Leclerc *et al.* 2019). En otro estudio se comprueba que las técnicas de compostaje de estiércol porcino aumenta la persistencia de ARGs en el suelo pero disminuye la presencia de ARGs en el estiércol (Xu *et al.* 2019). Por lo tanto, en cultivos cuyo suelo ha recibido enmiendas de estiércol -ya sea crudo o compostado-, los ARBs y ARGs pueden ser transferidos (Tien *et al.* 2017).

Las provincias de Tungurahua y Cotopaxi producen alrededor del 60% de huevos a nivel nacional (Bueno *et al.* 2016). Por lo que, la cantidad de residuos generados, y la utilización de los mismos en cultivos orgánicos es ampliamente extendida en la zona. Sin embargo, no se ha hecho una evaluación específica sobre el efecto que tiene la adición de esta gallinaza sobre los cultivos. Motivo por el cual, en la presente investigación evaluaremos la potencial diseminación de ARBs y ARGs en cultivos que han sido añadidos gallinaza comercial y gallinaza que ha recibido un compostaje tradicional utilizando técnicas de microbiología convencional y de biología molecular.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la aplicación de gallinaza de compostaje tradicional y comercial sobre las densidades de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos en cultivo de rábano y lechuga.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar indicadores microbiológicos como: *E. coli*, coliformes totales y aerobios totales y resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico en cultivos de rábano y lechuga aplicados gallinaza de compostaje tradicional y comercial.

Cuantificar las densidades de genes de resistencia a antibióticos: *sulI*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *tetW*, *ermB* y 16S rDNA en cultivos de rábano y lechuga aplicados gallinaza de compostaje tradicional y comercial.

- Evaluar la virulencia de *E. coli* por conjugación y perfiles de resistencia a antibióticos aislados a partir de rábanos y lechugas proveniente de cultivos aplicados gallinaza de compostaje tradicional y comercial.

1.3. Hipótesis

La adición de gallinaza al suelo puede influenciar en la transferencia de bacterias de resistencia a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en cultivos de rábano y lechuga.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Equipos y Materiales

2.1.1. Equipos

El proyecto requerirá los siguientes equipos:

- Incubadora
- Balanza
- Baño maría
- Vortex (Equipo utilizado para mezclar pequeños frascos con líquido)
- Centrífuga
- Agitador magnético
- Refrigerador
- Termociclador en tiempo real (7500 Fast Real Time System, Applied Biosystems).
- Cabina de bioseguridad tipo II
- Computador

2.1.2. Materiales y reactivos

El proyecto requerirá de los siguientes materiales y reactivos:

- Agar Chromocult
- Agar LB
- Agar MacConkey
- Agar Müller-Hinton
- Caldo LB

- Solución tampón PBS
- Glicerol
- Agua peptonada
- Discos de antibiótico (ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, amoxicilina / ácido clavulánico 21, nitrofurantoína, sulfametoxazol / trimetoprim, gentamicina, ampicilina, ertapenem, imipenem, cefoxitina, fosfomicina / trometamol, cloranfenicol, ciprofloxacina y azitromicina)
- Cajas Petri de plástico
- Cajas Petri de vidrio
- Asas o espátulas de digralsky
- Asa bacteriológica
- Botellas de cristal tapa azul (1000ml, 500ml, 100ml)
- Matraz Erlenmeyer (250ml)
- Pipetas
- Pera de succión
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Tubos eppendorf
- Tubos falcon
- Tubos de ensayo
- Tubos de vidrio tapa rosca
- Crioviales
- Frascos de orina estériles
- Hisopos de algodón
- Algodón
- Gasa y piola
- Mechero

- Placas de 96 pocillos para qPCR (Applied Biosystems).
- Kit de extracción de DNA genómico (PowerSoil, Qiagen, USA).
- Estándares para qPCR (*sul1*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *tetW*, *ermB*)
- Reactivos (Na₂CO₃, MgCl₂, CaCl₂, HCl, Sulfametoxazol (Antibiótico), Ácido Nalidíxico (Antibiótico), azida de sodio, ceftriaxona (Antibiótico))
- Bacteria *E. coli* J53
- Environmental Master Mix qPCR (Applied Biosystems).
- Primers y sondas de qPCR (*bla_{TEM}*, *sul1*, *qnrS*, *tetW*, *ermB*).
- Pie de rey
- Forcípula

2.2. Métodos y Protocolos

2.2.1. Microbiología

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

Las muestras (rábano y lechuga) fueron previamente lavadas, picadas, pesadas y colocadas en Erlenmeyers con tapones de algodón estériles para ser homogenizadas con PBS 1x en una proporción 1/10 (1/2) por medio de agitación vertical a 900 osc/min. Posteriormente se trasladó el sobrenadante en otro recipiente estéril, descartando los sólidos suspendidos. Continuando con los siguientes pasos:

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.

2.2.1.2. Criopreservación de bacterias aerobias (*E. coli*) resistentes a antibióticos (ácido nalidíxico, sulfametoxazol).

1. En tubos de vidrio con tapa rosca se colocó 5ml de caldo LB para las diferentes bacterias, se etiquetó y con la ayuda del asa previamente flameada en el mechero se tomó el inóculo. Se incubó durante 18-24 h a 37°C.
2. Una vez transcurrido el tiempo, en tubos de microcentrífuga se homogenizó las muestras con glicerol al 15%. Se etiquetó y guardó en congelación.

2.2.1.3. Perfiles de resistencia

Se utilizó la técnica de Kirby-Bauer o de difusión en disco recomendada por *Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (Hudzicki 2016)*.

1. Se etiquetó apropiadamente cada placa de agar Müller-Hinton (MH) (Referencia de: aislado, número de placa y fecha) para cada organismo analizado.
2. Se sumergió un hisopo estéril en el tubo de inóculo que alcanzaron 0,5 en la escala McFarland.

3. Se giró el hisopo contra el costado del tubo, aplicando presión firme contra las paredes internas del tubo con la finalidad de eliminar el exceso de líquido.
4. Se inoculó la superficie seca de una placa de agar MH con el hisopo tres veces sobre toda la superficie del agar; se procuró girar la placa de manera continua para asegurar la distribución pareja del inóculo.
5. Se bordeó la placa con el hisopo para recoger el exceso de líquido, desechando el hisopo en un contenedor para desechos biopeligrosos.
6. Dentro de la cabina de bioseguridad II, la placa fue dejada con su tapa entreabierta, permitiendo que la placa se asiente a temperatura ambiente en un intervalo de tiempo entre 5 a 15 minutos, favoreciendo que la superficie de la placa de agar se seque.
7. Se colocó los discos del panel de antibióticos a evaluar sobre la superficie del agar, utilizando pinzas anatómicas estériles.
8. Se aplicó una ligera presión para fijar el disco sobre la superficie del agar, a una distancia recomendada de más de 15 mm del borde de la placa, y de más de 30 mm entre discos, con la finalidad de no solapar los diámetros de difusión del antibiótico, y por ende de los halos de inhibición.
9. En las placas de 100 mm utilizadas no se colocó más de 4 discos de antibiótico.
10. Se incubó las placas a 35 - 37°C durante 18 o 24 horas. Las placas se colocaron en la incubadora en forma invertida para que el agua condensada no caiga sobre el agar; para precautelar un cambio indeseado en las condiciones del medio y en la lectura de los halos.
11. Transcurrido el tiempo establecido, se miden los diámetros de los halos de inhibición en mm, utilizando un calibrador o una regla de antibiograma.

12. Los resultados de los diámetros son contrastados con la tabla actualizada del CLSI, para categorizarlos como resistentes, sensibles o intermedios (**Clinical and Laboratory Standards Institute 2020**).

2.2.1.4. Conjugación

1. Se sembró en cajas con agar MacConkey + Azida de sodio la bacteria *E. coli* J53 (resistente a azida) y la bacteria de interés en agar MacConkey sin suplementación. Fueron incubadas por 18-24 h a 37°C.
2. Individualmente se tomó la cepa en cultivo puro y fue colocada en 5ml de caldo LB, se incubó por 18-24 h a 37°C. En el caso de la bacteria *E. coli* J53 se añadió azida (2µg/ml).
3. En tubos falcon se colocó 4ml de bacteria *E. coli* J53 y a 3260 x g se centrifugo durante 10 minutos, descartamos el líquido.
4. Se colocó 500 µl de caldo LB a cada tubo falcon, cada muestra se agito en vórtex por 6 segundos.
5. En tubos con tapa rosca, individualmente se colocó 500 µL de bacteria resistente a antibiótico con los 500 µL de caldo LB con bacteria *E. coli* J53, se complementó con 4 ml de caldo LB. Incubamos por 18-24 h a 37°C.
6. Se realizó el antibiograma incluyendo un testigo (*E. coli* J53), incubamos por 18-24 h a 37°C y se observó el diámetro de los halos.
7. Se evaluaron los diámetros por medio de las tablas del CLSI, tal y como se realizó en el experimento anterior.

2.2.2. Técnicas moleculares

2.2.2.1. Extracción de DNA

Este procedimiento se realizó con la ayuda del kit para 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 agregó 60 μL de la solución C1 y se mezcló por vórtex
3. Se colocó los tubos dentro del vórtex Mo-Bio de manera horizontal agitándolo a máxima velocidad durante 10 minutos.
4. Se centrifugo los tubos a 10.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente y se transferido el sobrenadante a un tubo de micro centrífuga.
5. Se adicionó 250 μL de la solución C2, mezclándolo por vórtex durante cinco segundos. Se puso a incubar a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugo a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 x g. Se transfirió 600 μL del sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Se aplicó 200 μL de la solución C3 y cuidadosamente se mezcló e incubó a 4°C durante 5 minutos. Se centrifugo a temperatura ambiente durante un minuto a 10.000 x g. fue transferido 750 μL del sobrenadante a un nuevo tubo.
7. Se agregó 1200 μL de la solución C4 al sobrenadante y se mezcló por vórtex durante cinco segundos.
8. Se colocó aproximadamente 675 μL dentro del filtro provisto dentro del Kit, y se puso a centrifugar a 10.000 x g 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 centrifugo a temperatura ambiente por 30 segundos a 10.000 x g se descartó el flujo.
10. Se colocó en la centrifuga nuevamente a temperatura ambiente por un minuto a 10.000 x g.

11. Cuidadosamente se colocó el filtro en un tubo de micro centrifuga limpio y se adicionó 100 μL de la solución C6 al centro de la membrana. Se colocó en la centrifuga a temperatura ambiente durante 30 segundos a $10.000 \times g$., posteriormente se desechó el filtro.
12. Se almacenó el DNA en congelación a -20°C .

2.2.2.2. Cuantificación de genes de resistencia a antibióticos

La metodología realizada para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica TaqMan para los genes *sul1*, *bla_{TEM}*, *tetW*, *qnrS* y 16S rDNA fue 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. $18 \mu\text{M}$. Sonda: Conc. $5 \mu\text{M}$.
TaqMan	10	TaqMan Master Mix ambiental: 2.0.
Muestra	9	ADN bacteriano

Fuente: Autor

Donde se siguió los siguientes pasos:

1. Se calculó el volumen a utilizar, del reactivo TaqMan environmental master mix y Primer + Sonda para el número de muestras a analizar y se mezcló en un tubo Eppendorf nuevo y estéril.
2. Se transfirió $11 \mu\text{L}$ de la mezcla a cada pocillo de la placa óptica.
3. Se añadió a los pocillos de la placa un volumen de $9 \mu\text{L}$ de los estándares (3) y de cada muestra a investigar. El orden y la cantidad dependió de la cantidad de muestras analizadas.

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 2**.

Tabla 2. Secuencia de nucleótidos de primers y sondas de qPCR

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

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

La cosecha de los rábanos se realizó cuando culminó el ciclo vegetativo, es decir en 30 días y en las lechugas en 120 días después del trasplante, el porcentaje destinado para conocer la media del diámetro ecuatorial y peso, mostraron altos valores en rábanos y lechugas donde se aplicaron gallinaza comercial : 5,5 cm – 32,29 g; 13,09 cm – 364,81 g, respectivamente.

Con respecto a las densidades microbiológicas y de genes de resistencia a antibióticos, para cada uno de los parámetros estudiados se presentan como el promedio y la desviación estándar calculada, así como el resumen de los resultados estadísticos, los cuales son presentados de manera ampliada en Anexos.

3.1.1. Microorganismos aerobios

Para analizar el efecto de la adición de gallinaza sobre las densidades de bacterias y ARGs en las hortalizas cultivadas, se realizó un análisis de varianza y una prueba de medias de Tukey, para observar las diferencias entre tratamientos. La tabla 3 y 4 detallan los resultados para rábano y lechuga, respectivamente.

Tabla 3. Microorganismos aerobios (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), coliformes (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) y *E. coli* (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) en rábano.

Variables	TRATAMIENTOS (UFC/g)		
	Compostaje Tradicional	Comercial	Sustrato (CONTROL)
<i>E. coli</i> **	6,67 x 10 ² (4,16 x 10 ²) ^A	2,33 x 10 ² (5,77 x 10 ¹) ^A	<3.16 x 10 ¹ ^B
<i>E. coli</i> ^{RS} *	2 x 10 ² (1 x 10 ²) ^A	6,67 x 10 ¹ (5,77 x 10 ¹) ^{AB}	<3.16 x 10 ¹ ^B
<i>E. coli</i> ^{RAN}	1 x 10 ² (0 x 10 ⁰)	< 3.16 x 10 ¹ (bld)	<3.16 x 10 ¹ (bld)
Colif. Totales **	1,73 x 10 ⁴ (1,93 x 10 ³) ^A	2,33 x 10 ² (5,77 x 10 ¹) ^B	4,22 X 10 ¹ (1,83 x 10 ¹) ^C
Colif. ^{RS} *	2 x 10 ² (1 x 10 ²) ^A	6,67 x 10 ¹ (5,77 x 10 ¹) ^{AB}	<3.16 x 10 ¹ ^B (bld)
Colif. ^{RAN} **	1,33 x 10 ² (5,77 x 10 ¹) ^A	<3.16 x 10 ¹ ^B (bld)	<3.16 x 10 ¹ ^B (bld)
Aerob. Totales **	8,17 x 10 ⁴ (9,50 x 10 ³) ^A	5,77 x 10 ³ (5,51 x 10 ²) ^B	1,37 X 10 ⁴ (3 x 10 ³) ^C
Aerobios ^{RS} **	2,95 x 10 ³ (2,24 x 10 ²) ^A	2 x 10 ² (7,96 x 10 ¹) ^B	1,01 X 10 ³ (9,49 x 10 ¹) ^C
Aerobios ^{RAN} **	1 x 10 ⁴ (7,51 x 10 ²) ^A	3,38 x 10 ⁴ (1,12 x 10 ⁴) ^B	8,54 X 10 ² (9,49 X 10 ¹) ^C

Leyenda: p< 0,05 significativo al 95% (*); p< 0,01 significativo al 99% (**)

Fuente: Autor

En el cultivo de rábano, se observa que existe una influencia altamente significativa ($p < 0,01$) entre tratamientos para los parámetros microbiológicos de *E. coli*, coliformes totales, coliformes resistentes a ácido nalidíxico, aerobios totales y aerobios resistentes a sulfametoxazol; y significativa ($p < 0,05$) en *E. coli* resistente a sulfametoxazol y coliformes resistentes a sulfametoxazol y aerobios resistentes a ácido nalidíxico. En todos los parámetros, las poblaciones bacterianas más altas estadísticamente en el caso de rábanos cultivados con gallinaza de compostaje tradicional, seguidos de los cultivados con gallinaza comercial, y por último, los cultivados en el sustrato (control) sin adición de gallinaza.

Por medio del análisis de prueba de medias, los niveles de *E. coli* en rábanos cultivados con compostaje tradicional y gallinaza comercial son significativas en comparación del control, siendo

mayor la concentración bacteriana en el tratamiento de compostaje tradicional. En el caso de *E. coli* resistente a sulfametoxazol y coliformes resistentes a sulfametoxazol, las medias entre rábanos cultivados con compostaje tradicional en comparación del control no son significativas, siendo los niveles muy bajos en rábanos cultivados con gallinaza comercial.

Por otro lado, en coliformes totales, aerobios totales, aerobios resistentes a sulfametoxazol y a ácido nalidíxico, las medias de los tres tratamientos son significativas, siendo el de mayor concentración bacteriana los rábanos cultivados con compostaje tradicional. Y en coliformes resistentes a ácido nalidíxico, las medias de las densidades bacterianas en compostaje tradicional fue el único cuantificable en comparación de los otros tratamientos, tal como se puede observar en la **Tabla 3**.

Tabla 4. Microorganismos aerobios (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico), coliformes (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) y *E. coli* (totales, resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico) en lechuga.

Variables	TRATAMIENTOS		
	Compostaje Tradicional	Comercial	Sustrato (CONTROL)
<i>E. coli</i> **	9,59 x 10 ² (1,11 X 10 ²) ^A	<3.16 x 10 ¹ ^B (bld)	<3.16 x 10 ¹ ^B (bld)
<i>E. coli</i> ^{RS} *	<3.16 x 10 ¹ (bld)	<3.16 x 10 ¹ (bld)	<3.16 x 10 ¹ (bld)
<i>E. coli</i> ^{RAN} *	<3.16 x 10 ¹ (bld)	<3.16 x 10 ¹ (bld)	<3.16 x 10 ¹ (bld)
Colif. Totales **	3,26 X 10 ³ (3,59 X 10 ²) ^A	1,25 X 10 ³ (1,49 X 10 ²) ^B	5,80 X 10 ² (1,11 X 10 ²) ^C
Colif. ^{RS} *	<3.16 x 10 ¹ ^A (bld)	2,11 X 10 ¹ (1,83 X 10 ¹) ^{AB}	3,88 X 10 ¹ (2,18 X 10 ¹) ^B
Colif. ^{RAN} *	<3.16 x 10 ¹ ^A (bld)	2,11 X 10 ¹ (1,83 X 10 ¹) ^{AB}	2,11 X 10 ¹ (1,83 X 10 ¹) ^B
Aerob. Totales **	1,47 X 10 ³ (1,49 X 10 ²) ^A	1,06 X 10 ⁴ (6 X 10 ²) ^A	1,17 X 10 ⁴ (6,11 X 10 ²) ^B
Aerobios ^{RS} *	7,38 X 10 ² (6,58 X 10 ¹) ^A	2,89 X 10 ³ (1,11 X 10 ²) ^B	1,67 X 10 ² (1,15 X 10 ²) ^C
Aerobios ^{RAN} *	1,12 X 10 ³ (1,93 X 10 ²) ^A	3,87 X 10 ³ (3,06 X 10 ²) ^B	2,15 X 10 ³ (1,90 X 10 ²) ^C

Legenda: p< 0,05 significativo al 95% (*); p< 0,01 significativo al 99% (**)

Fuente: Autor

En el cultivo de lechuga, se observa que existe una influencia altamente significativa ($p < 0,01$) entre tratamientos para los parámetros microbiológicos de *E. coli*, coliformes totales y aerobios totales; y significativa ($p < 0,05$) en coliformes resistentes a sulfametoxazol y coliformes resistentes a ácido nalidíxico, así como en aerobios resistentes tanto a ácido nalidíxico, como a sulfametoxazol. No fueron cuantificables las densidades de *E. coli* resistentes a sulfametoxazol y a ácido nalidíxico. Al igual que en rábano, las densidades de bacterias en lechuga son estadísticamente más altas en el caso de las lechugas cultivadas con gallinaza de compostaje tradicional, seguidas de las cultivadas con gallinaza comercial y por último, las cultivadas en el control sin adición de gallinaza.

Por medio del análisis de prueba de medias, en el caso de *E. coli* se observa que la lechuga en la que fue añadida y cultivada con gallinaza de compostaje tradicional fue la única en la que se detectaron niveles cuantificables. En el caso de coliformes totales, las medias son significativamente diferentes entre los tratamientos, detectándose densidades elevadas en el caso de la lechuga cultivada con gallinaza de compostaje tradicional. Mientras tanto en coliformes resistentes a sulfametoxazol y a ácido nalidíxico las medias no fueron significativas en comparación del control (sustrato) teniendo en cuenta que el mayor nivel bacteriano fue en lechugas añadidas gallinaza de compostaje tradicional en comparación del tratamiento de gallinaza comercial.

La cuantificación bacteriana de aerobios totales de los tratamientos de gallinaza de compostaje tradicional junto con el de gallinaza comercial no son tan significativas entre ellas pero si al frente del control destacando que la mayor concentración fue en compostaje tradicional. Para coliformes resistentes a sulfametoxazol y a ácido nalidíxico las medias de los 3 tratamientos en los dos casos fueron significativas. Tal como se puede observar en la **Tabla 4**.

3.1.2. Perfiles de resistencia

Con la finalidad de evaluar la virulencia de los aislamientos de *E. coli* recuperados a partir de las hortalizas, se realizó un análisis de los perfiles fenotípicos de resistencia a antibióticos. Al encontrarse *E. coli* en los 2 tratamientos en rábano y en lechuga solo en un tratamiento, se utilizaron 6 cepas de diferentes tratamientos para la determinación del perfil de resistencia antibiótica, el cual se lo realizó mediante el método de difusión de discos o técnica de Kirby-Bauer. Las cepas aisladas fueron sembradas en agar Mueller-Hinton y se evaluó su sensibilidad frente a 18 antibióticos de interés sanitario: Gentamicina (CN10), estreptomina (S10), amikacina (AK30), ertapenem (ETP10), imipenem (IMP10), ceftriaxona (CRO30), ceftazidima (CAZ30), fosfomicina/trometamol (FOT200), ciprofloxacina (CIP5), azitromicina (AZM15), nitrofurantoína (F300), cloranfenicol (C30), tetraciclina (TE30), sulfametoxazol/trimetoprima (SXT25), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC30) y ampicilina (AMP10). Fenotípicamente se evaluó la producción de *E. coli* β -lactamasas con los antibióticos Cefepima (FEP30), ceftazidima (CAZ30), ceftriaxona (CRO30) y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC30), siendo negativos para todas las bacterias analizadas. El diámetro del halo de inhibición permitió interpretar el grado de resistencia microbiana de cepas como sensibles, intermedias o resistentes (**Clinical and Laboratory Standards Institute 2020**). Como se puede observar en el **Gráfico 1 y Tabla 5**.

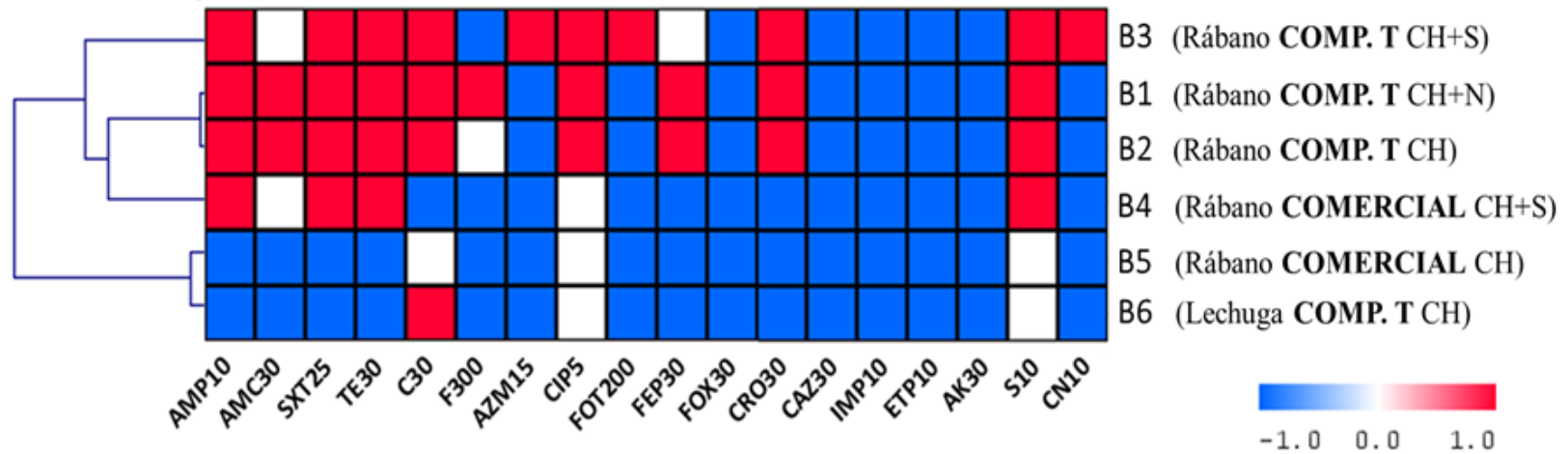
Tabla 5. Media del diámetro del halo de inhibición de 6 cepas de E. coli aislados de rábanos y lechugas, usando 18 antibióticos.

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	DISCO	B1 (Rábano COMP. T CH +N)		B2 (Rábano COMP. T CH)		B3 (Rábano COMP. T CH+ S)		B4 (Rábano COMER. CH+S)		B5 (Rábano COMER. CH)		B6 (Lechuga COMP. T CH)	
			X	CATEGORIA	X	CATEGORIA	X	CATEGORIA	X	CATEGORIA	X	CATEGORIA	X	CATEGORIA
Aminoglucósidos	Gentamicina	CN10	17	-1.0	17	-1.0	6	1.0	17	-1.0	18	-1.0	17	-1.0
	Estreptomina	S10	6	1.0	6	1.0	6	1.0	6	1.0	14	0.0	14	0.0
	Amikacina	AK30	20	-1.0	18	-1.0	17	-1.0	18	-1.0	18	-1.0	19	-1.0
Carbapenémicos	Ertapenem	ETP10	28	-1.0	28	-1.0	28	-1.0	29	-1.0	32	-1.0	29	-1.0
	Imipenem	IMP10	27	-1.0	26	-1.0	25	-1.0	27	-1.0	29	-1.0	29	-1.0
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ30	23	-1.0	25	-1.0	23	-1.0	30	-1.0	29	-1.0	30	-1.0
	Ceftriaxona	CRO30	13	1.0	15	1.0	7	1.0	28	-1.0	27	-1.0	29	-1.0
	Cefepima	FEP30	14	1.0	15	1.0	21	0.0	33	-1.0	31	-1.0	33	-1.0
	Cefoxitina	FOX30	20	-1.0	21	-1.0	29	-1.0	20	-1.0	21	-1.0	29	-1.0
Fosfomicinas	Fosfomicina/trometamol	FOT200	29	-1.0	30	-1.0	6	1.0	26	-1.0	32	-1.0	27	-1.0
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP5	6	1.0	6	1.0	10	1.0	29	0.0	29	0.0	26	0.0
Macrólidos	Azitromicina	AZM15	14	-1.0	17	-1.0	10	1.0	14	-1.0	17	-1.0	11	-1.0
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	F300	12	1.0	16	0.0	19	-1.0	19	-1.0	24	-1.0	17	-1.0
Fenicoles	Cloranfenicol	C30	8	1.0	9	1.0	6	1.0	28	-1.0	17	0.0	12	1.0
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE30	8	1.0	7	1.0	8	1.0	6	1.0	28	-1.0	15	-1.0
Sulfonamidas	Sulfametoxazol/trimetoprima	SXT25	6	1.0	6	1.0	6	1.0	6	1.0	31	-1.0	20	-1.0
β- lactámicos	Amoxicilina/Ac. Clavulánico	AMC30	11	1.0	11	1.0	17	0.0	14	0.0	21	-1.0	22	-1.0
	Ampicilina	AMP10	6	1.0	6	1.0	6	1.0	6	1.0	22	-1.0	17	-1.0
TOTAL	11 FAMILIAS			9		7		9		4		0		1

Los casilleros que poseen el número (-1.0) según su halo de inhibición son catalogadas como SENSIBLES, mientras que los que poseen (1.0) son catalogados como RESISTENTES por lo tanto los que tienen el (0.0) son los INTERMEDIOS de un antibiótico. Además las cepas que resultan resistentes a más de dos familias de antimicrobianos son consideradas MULTIRESISTENTES.

Fuente: Autor

Gráfico 1. Perfiles de resistencia de 6 cepas de E. coli aisladas de rábanos y lechugas, usando 18 antibióticos.



Los casilleros que poseen el color azul son aquellos que se catalogaron como SENSIBLES ante los antibióticos mientras que los que son de color rojo son los que resultaron RESISTENTES y los de color blanco son aquellos que se catalogaron INTERMEDIOS. De las 6 cepas estudiadas, 4 fueron consideradas MULTIRESISTENTES porque mostraron resistencia a más de dos familias de antimicrobianos. Las cepas que no se mostraron como multiresistentes fueron la bacteria 5 y bacteria 6.

Fuente: Autor

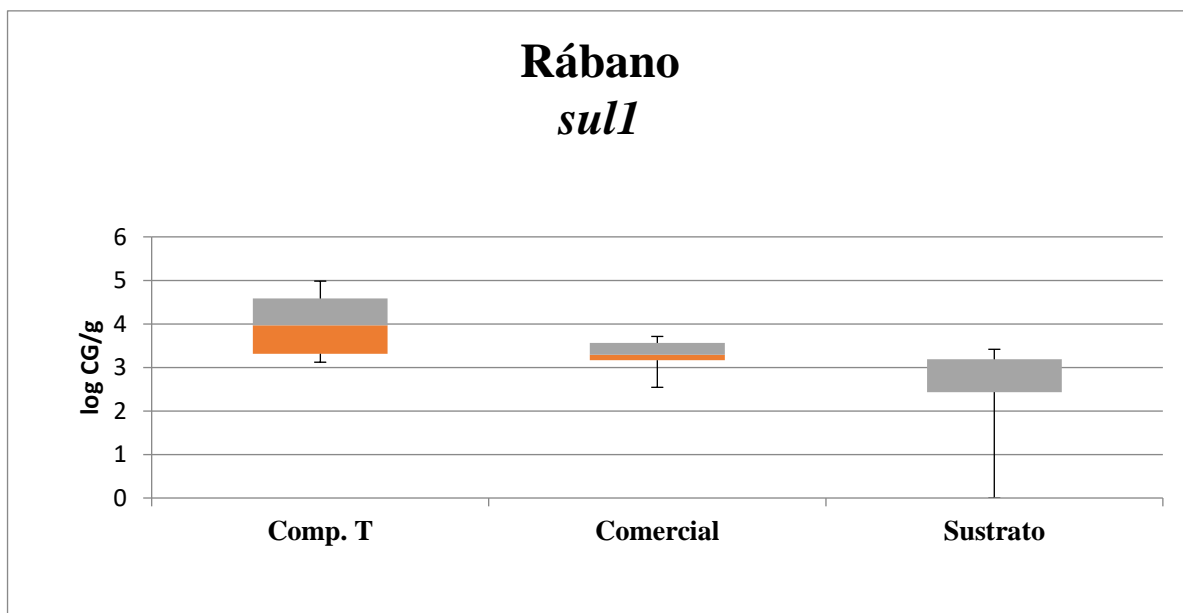
3.1.3. Conjugación

Con la finalidad de evaluar si las bacterias analizadas son capaces de transferir sus mecanismos de resistencia por medio de plásmidos, se realizó un ensayo de conjugación entre la biomasa de los mismos y la cepa receptora *E. coli* J53 (azida resistente). Sin embargo, los ensayos no fueron positivos, denotando que los mecanismos de resistencia antibiótica de estas bacterias se encuentran codificados en cromosomas y no en plásmidos.

3.1.4. Cuantificación de ARGs en vegetales

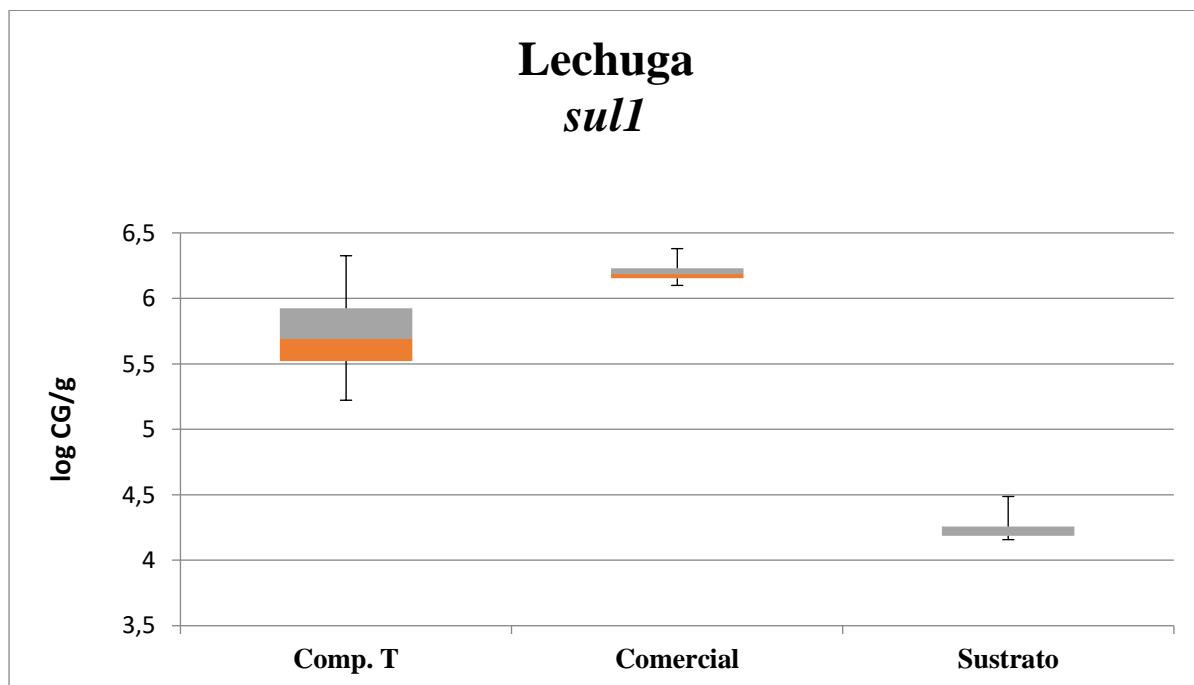
Se realizó la extracción de DNA de muestras compuestas de vegetales y su cuantificación por qPCR, donde se reveló un 94,44 % de casos positivos para *sul1* en rábano y en lechuga el 100 % ; en el caso de *bla*_{TEM} en rábano se detectó un 5,55 % de casos positivos mientras que en lechuga un 33,33 %. Por otro lado, no existió presencia mínima de genes como: *qnrS*, *tetW*, *ermB* y 16S rDNA, por lo que no hubo detección.

Gráfico 2. Boxplots gen *sul1* en rábano



En el caso del gen *sull* en rábano, se observa que existe una influencia significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos, donde se detectó un 100 % de las muestras analizadas en la fracción de compostaje tradicional, 100 % en la fracción comercial y 83 % en la fracción de sustrato (control). La mayor abundancia fue detectada en rábanos cultivados en sustrato con compostaje tradicional y sustrato con gallinaza comercial en comparación del control, pero el nivel fue mayor en rábanos cultivados en sustrato con compostaje tradicional. Tal como se puede visualizar en el gráfico N° 2.

Gráfico 3. Boxplots del gen *sull* en lechuga

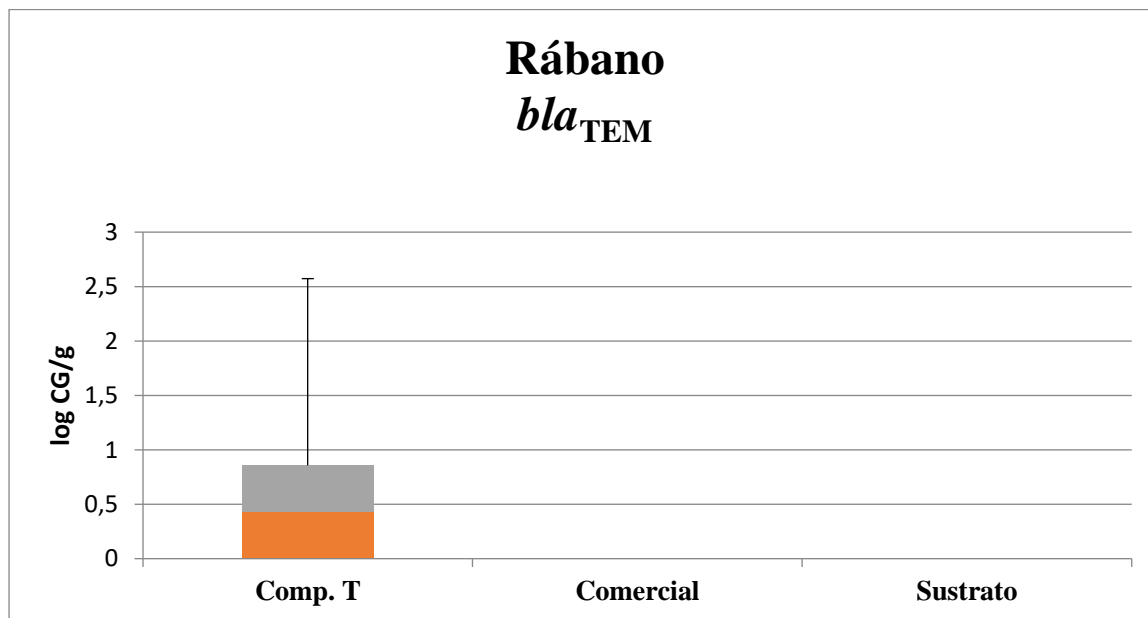


Fuente: Autor

Por otra parte, en el caso de *sull* en lechuga también se observa que existe una influencia significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos, donde se detectó un 100 % de las muestras analizadas en la fracción de compostaje tradicional, 100 % en la fracción comercial y 100 % en la fracción de sustrato (control). En el tratamiento de compostaje tradicional en comparación del tratamiento de

gallinaza comercial no existe mucha significancia, pero si entre el control. Tal como se puede visualizar en el gráfico N° 3.

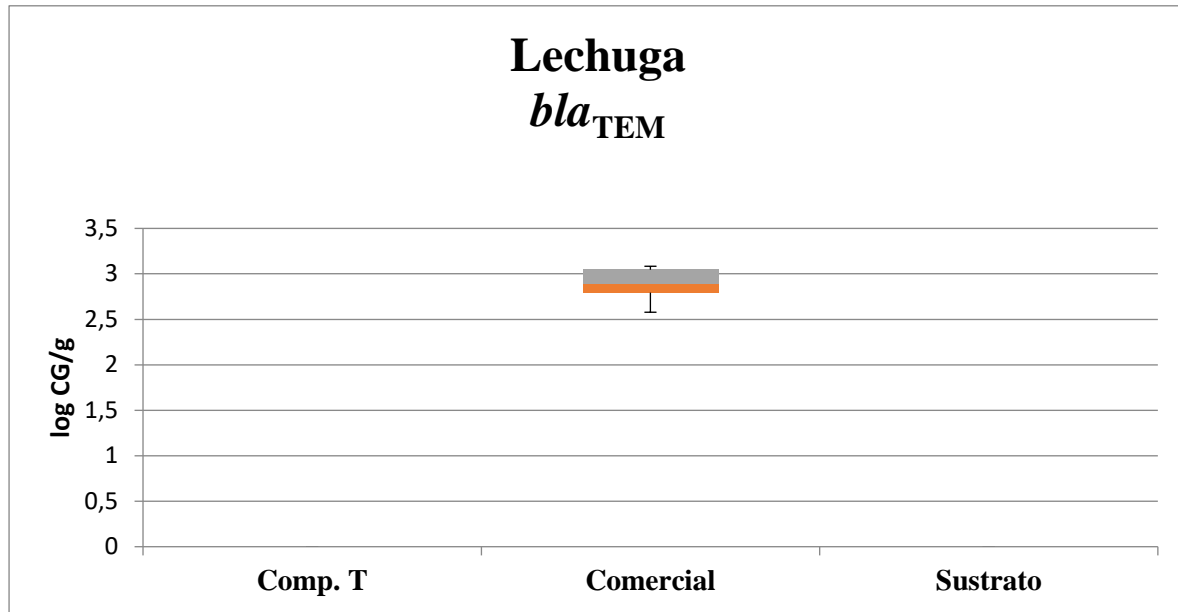
Gráfico 4. Boxplots del gen bla_{TEM} en rábano



Fuente: Autor

En el caso de bla_{TEM} en rábano, se observa que existe una influencia significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos, donde se detectó el 16,67 % en la fracción de compostaje tradicional y 0 % en las fracciones de gallinaza comercial y sustrato (control). Tal como se puede visualizar en el gráfico N° 4.

Gráfico 5. Boxplots del gen *bla*_{TEM} en lechuga



Fuente: Autor

Sin embargo, en el caso de *bla*_{TEM} en lechuga, se observa que existe una influencia altamente significativa ($p < 0,01$) entre tratamientos, donde se detectó un 100 % en la fracción de gallinaza comercial y en las fracciones de compostaje tradicional y sustrato (control) se detectó un 0%. Tal como se puede visualizar en el gráfico N° 5.

3.2. Discusión

A partir de los hallazgos encontrados en la presente investigación, por medio del análisis de los indicadores microbiológicos (*E. coli*, *E. coli*^{RS}, *E. coli*^{RAN}, coliformes totales, coliformes^{RS}, coliformes^{RAN}, aerobios totales, aerobios^{RS} y aerobios^{RAN}); se detectó que las mayores densidades bacterianas fueron aisladas a partir de rábanos y lechugas cultivados con gallinaza de compostaje tradicional. Adicionalmente, las densidades de ARBs en rábanos fueron aún más altas que los

valores de lechuga; hallazgo que guarda concordancia con lo detectado en la investigación de **Tien et al. (2017)**, en donde se explica que los vegetales que mantienen contacto directo con el suelo enmendado con estiércol crudo o compostado, tienen altas posibilidades de que los ARBs sean detectados en mayores densidades; en comparación de vegetales que no tienen contacto directo; tal es el caso de la lechuga, espinaca y col rizada. Otra investigación que demuestra que la fertilización practicada en sistemas de producción orgánica tiende a incrementar significativamente los niveles de bacterias entéricas, en contraste a las granjas convencionales, es la publicada por **(Szczech et al. 2018)**. Las enmiendas de abonos de origen animal pueden ser beneficiosas desde el punto de vista macromolecular. Sin embargo, estas investigaciones demuestran que pueden tener un efecto negativo desde el punto de vista sanitario, constituyendo estos alimentos en una potencial vía de entrada de potenciales patógenos zoonóticos dentro de la cadena alimentaria.

Con respecto a la frecuencia de detección de estos contaminantes en los rábanos y lechugas cultivadas con gallinaza de compostaje tradicional, gallinaza comercial y sustrato (testigo); se observó que en todas las muestras existió presencia de coliformes totales; sin embargo se encontró el 50% de *E. coli* del total de las muestras. Estos porcentajes son superiores a los detectados en estudios realizados en países como India, Pakistán, Estados Unidos y Turquía, ya que en sus estudios presentan porcentajes de *E. coli*, 16.7%, 34%, 17% y 18.75% respectivamente; en los cuales las muestras analizadas como: pepino, zanahoria, lechuga, rábano, espinaca, col fueron recolectadas de mercados locales donde los mismos agricultores comercializan sus productos **(Kumar y Kumar 2017, Shah et al. 2015, Scheinberg et al. 2017, Albarri et al. 2017)**. Una investigación complementaria del grupo de investigación UTA RAM One Health estudiará las densidades y la virulencia asociada a los aislamientos de enterobacterias en vegetales de diversos orígenes a nivel de expendio en mercados, con la finalidad de rastrear potenciales patógenos que representan los agentes causales de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos.

En nuestro estudio, de manera aleatoria se seleccionaron colonias de *E. coli* para la evaluación de sus perfiles de resistencia a antibióticos, así como su capacidad de transferir sus plásmidos por medio de conjugación. Es de especial interés la detección de perfiles de multirresistencia a antibióticos en colonias aisladas a partir de vegetales cosechados con suelos suplementados con gallinaza de compostaje tradicional. Desde el punto de vista sanitario, estos aislamientos presentan resistencia a antibióticos a familias de antibióticos de relevancia clínica, como cefalosporinas, fluoroquinolonas, betalactámicos, fenicoles y aminoglucósidos. El ensayo de conjugación fue negativo, motivo por el cual se puede demostrar que estos mecanismos de resistencia no están codificados en plásmidos, en el caso de estos aislamientos. La detección de perfiles de multirresistencia en aislamientos de *E. coli* provenientes de vegetales contaminados por agua de irrigación o enmiendas de origen animal son ampliamente estudiadas alrededor del mundo, como por ejemplo en Portugal (**Araújo et al. 2017**), República Checa (**Skočková et al. 2013**), Japón (**Wang et al. 2017**), Argentina (**González et al. 2017**), India (**Sharma et al. 2020**), Cuba (**Cabrera Rodríguez et al. 2019**), entre otros países. Por lo tanto, existen evidencias que nos permiten elaborar la hipótesis que una de las principales vías de diseminación de bacterias entéricas multirresistentes pueden ser los vegetales contaminados.

Con respecto a ARGs, en este estudio se detectaron niveles de detección para los genes de resistencia a sulfonamidas *sulI* y de betalactámicos *bla*_{TEM} en rábanos y lechugas cultivados con gallinaza de compostaje tradicional y gallinaza comercial. Los otros genes evaluados se encontraron por debajo del límite de detección del método. Es notable que las densidades de los ARGs se incrementan significativamente en los vegetales cultivados a partir de suelos suplementados con gallinaza fresca. Estudios relacionados han detectado un incremento variable en las cantidades de diferentes ARGs utilizados como indicadores; como por ejemplo en Canadá, en un estudio realizado en campos con suplemento de lodos de depuradora (**Lau et al. 2017**); en China, en un estudio cuantificando ARGs en vegetales cultivados en suelos suplementados con estiércol de gallina, de cerdos y de ganado vacuno (**Duan et al. 2019**); en China, después de la aplicación de estiércol de gallina en cultivos de lechuga (**Zhang et al. 2019**); Los resultados de

Lau et al. (2017), en su investigación coinciden, ya que aplicaron lodos municipales que recibieron tratamiento en cultivos de rábanos, zanahoria y lechuga, donde no se observó altos niveles de ARGs como se esperaba a excepción del gen *sul1*, conviene enfatizar que se usó la técnica de qPCR al igual que en este estudio. Mientras que en su investigación, **Tien et al. (2017)** confirma que cultivos donde han empleado estiércol crudo de animales el nivel de ARGs es mayor en comparación de cultivos que han recibido abono compostado. También **Urrea et al. (2019)** menciona que el estiércol de pollo crudo posee altos niveles de ARGs. Al igual que **Jacobs et al. (2019)**, halló en rábanos y lechugas enmendadas con estiércol crudo de vacas, niveles sumamente altos de *sul1*. Por lo que se coincide con **Deng et al. (2020)**, ya que detecta que el proceso de compostaje reduce los niveles de ARGs y ARBs, lo que explicaría la ausencia de los demás genes. Todos estos estudios afirman que la suplementación de estiércol animal tiende a incrementar los eventos de HGT en suelos y de transmisión dentro de la cadena alimentaria (**Marti et al. 2013, Jung et al. 2014, Pu et al. 2019**).

3.3. Verificación de la hipótesis

Al finalizar con el estudio, se acepta la hipótesis planteada. La gallinaza (compostada tradicionalmente y de presentación comercial) presentó niveles significativos en las densidades de ARBs y ARGs en vegetales (rábano y lechuga).

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se evaluó el efecto de la aplicación de gallinaza de compostaje tradicional y gallinaza comercial sobre las densidades de bacterias resistentes, donde las muestras de rábanos y lechugas cuyo sustrato fue abonado con gallinaza de compostaje tradicional, presentaron altos niveles significativos seguido de las muestras que fueron abonadas con gallinaza comercial, en cuanto a genes de resistencia a antibióticos solo se observó altos niveles en muestras de rábanos y lechugas de compostaje tradicional. Por lo tanto la gallinaza de compostaje tradicional actuó como diseminación de ARBs y no de ARGs.
- Se cuantificó indicadores microbiológicos como: *E. coli*, coliformes totales y aerobios totales y resistentes a sulfametoxazol y ácido nalidíxico en cultivos de rábanos y lechugas aplicados gallinaza de compostaje tradicional y comercial. Estadísticamente, se pudo constatar, que los rábanos y lechugas a los cuales fueron aplicados gallinaza de compostaje tradicional tuvieron valores significativamente altos, en comparación a los controles.
- Se cuantificó las densidades de genes de resistencia a antibióticos mediante la técnica de qPCR, donde los genes como: *qnrS*, *tetW*, *ermB* y 16S rDNA no presentaron valores de detección del método, por otro lado los genes: *sulI* y *bla_{TEM}* presentaron altos niveles de detección en rábanos y lechugas que fueron cultivadas con gallinaza de compostaje tradicional.
- Se evaluó la virulencia de *E. coli* por conjugación usando la cepa receptora *E. coli* J53 (azida resistente), cuyos ensayos resultaron ser negativos. Sin embargo, se pudo constatar

que los mecanismos de resistencia antibiótica de las 6 cepas aisladas a partir de rábanos y lechugas proveniente de cultivos aplicados gallinaza de compostaje tradicional y comercial no se encontraban codificadas en plásmidos sino en cromosomas. Con respecto a los perfiles de resistencia a antibióticos, 4 de las 6 cepas que fueron aisladas mostraron resistencia a más de 2 familias de antibióticos, por lo que se catalogaron como multirresistentes.

4.2. Recomendaciones

- Se considera importante descartar el uso del compost que no ha tenido un control en su descomposición, especialmente aquellos que son de origen animal, en particular los compostajes que lleguen a poseer excretas de aves, ya que al tener un control en su descomposición nos aseguramos la destrucción no solo de bacterias como: *E.coli* y *Salmonella spp*, las cuales son reservorios de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos, sino también de esporas de hongos fitopatógenos y semillas de malezas.

- Es necesario que la Facultad de Ciencias Agropecuarias sea el portavoz de este tipo de investigaciones mediante congresos, talleres, entre otros., para que la información sea difundida a estudiantes, profesionales, especialmente a personas dedicadas a la agricultura, con la finalidad de destacar la importancia del manejo de residuos de origen animal y de esta manera evitar que estos sean aplicados directamente al suelo sin haber tenido un correcto tratamiento de descomposición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adekiya, AO; Agbede, TM; Aboyeji, CM; Dunsin, O; Simeon, VT. 2019. Effects of biochar and poultry manure on soil characteristics and the yield of radish. *Scientia Horticulturae* 243:457-463. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.048>.
- Albarri, O; Meral, M; Heshmati, B. 2017. Prevalence of *Escherichia coli* isolated from meat , chicken and vegetable samples in Turkey Prevalence of *Escherichia coli* isolated from meat , chicken and vegetable samples in Turkey Institute of Natural and Applied Sciences (Fen Bilimleri Enstitüsü), (en línea). *Journal of Biotechnology Science Research* 4(3):214-222. Consultado 6 abr. 2020. Disponible en <http://issrpublishing.com/jbsr/>.
- Araújo, S; A.T. Silva, I; Tacão, M; Patinha, C; Alves, A; Henriques, I. 2017. Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. *International Journal of Food Microbiology* 257:192-200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.020>.
- 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 Rodriguez, LE; Díaz Rigau, L; Miralles Suarez, AI; Ones Roque, R; Torres Herrera, Y; Pantaleón Hernández, M. 2019. Efectividad in vitro de la amikacina y fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* uropatógena multidrogosresistentes | Cabrera Rodriguez | Correo Científico Médico (en línea, sitio web). Consultado 6 abr. 2020. Disponible en <http://revcocmed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/3253>.
- Carvalho, G; Fouchet, D; Danesh, G; Godeux, A-S; Laaberki, M-H; Pontier, D; Charpentier, X; Venner, S. 2019. Bacterial transformation buffers environmental fluctuations through the reversible integration of mobile genetic elements (en línea). *bioRxiv* :557462. DOI:

<https://doi.org/10.1101/557462>.

Centers for Disease Control and Prevention . 2018. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Ready-to-Eat Salads | CDC (en línea, sitio web). Consultado 6 feb. 2020. Disponible en <https://www.cdc.gov/ecoli/2017/o157h7-12-17/index.html>

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>.

Cheng, W; Li, J; Wu, Y; Xu, L; Su, C; Qian, Y; Zhu, YG; Chen, H. 2016. Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study. *Journal of Hazardous Materials* 304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.037>.

Chung, HS; Lee, YJ; Rahman, MM; Abd El-Aty, AM; Lee, HS; Kabir, MH; Kim, SW; Park, BJ; Kim, JE; Hacımüftüoğlu, F; Nahar, N; Shin, HC; Shim, JH. 2017. Uptake of the veterinary antibiotics chlortetracycline, enrofloxacin, and sulphathiazole from soil by radish. *Science of the Total Environment* 605-606:322-331. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.231>.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. CLSI M100 ED30 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. s.l., s.e.

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>.

- Cornejo, J; Yevenes, K; Avello, C; Pokrant, E; Maddaleno, A; Martin, B; Lapierre, L. 2018. Determination of Chlortetracycline Residues, Antimicrobial Activity and Presence of Resistance Genes in Droppings of Experimentally Treated Broiler Chickens (en línea). *Molecules* 23(6):1264. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23061264>.
- Czekalski, N; Berthold, T; Caucci, S; Egli, A; Bürgmann, H. 2012. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland (en línea). *Frontiers in Microbiology* 3(MAR). DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>.
- Deng, W; Zhang, A; Chen, S; He, X; Jin, L; Yu, X; Yang, S; Li, B; Fan, L; Ji, L; Pan, X; Zou, L. 2020. Heavy metals, antibiotics and nutrients affect the bacterial community and resistance genes in chicken manure composting and fertilized soil. *Journal of Environmental Management* 257:109980. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109980>.
- Dixit, S; Dubey, AK; Dube, H V; Dwivedi, PK. 2018. Effect of integrated management of inorganic and organic fertilizers on yield, soil fertility and storage life of Rabi onion (*Allium cepa* L.). ~ 3077 ~ *International Journal of Chemical Studies* 6(2):3077-3080.
- Duan, M; Gu, J; Wang, X; Li, Y; Zhang, R; Hu, T; Zhou, B. 2019. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 180:114-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.005>.
- Dungan, RS; Strausbaugh, CA; Leytem, AB. 2019. Survey of selected antibiotic resistance genes in agricultural and non-agricultural soils in south-central Idaho (en línea). *FEMS Microbiology Ecology* 95(6). DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz071>.
- González, J; Cadona, JS; Sanz, M; Bustamante, A V.; Sanso, AM. 2017. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 261:57-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.021>.

- Guron, GKP; Arango-Argoty, G; Zhang, L; Pruden, A; Ponder, MA. 2019. Effects of Dairy Manure-Based Amendments and Soil Texture on Lettuce- and Radish-Associated Microbiota and Resistomes (en línea). *mSphere* 4(3):e00239-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.00239-19>.
- Habteselassie, MY; Bischoff, M; Applegate, B; Reuhs, B; Turco, RF. 2010. Understanding the role of agricultural practices in the potential colonization and contamination by *Escherichia coli* in the rhizospheres of fresh produce. *Journal of Food Protection* 73(11):2001-2009. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.11.2001>
- 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>.
- Hossain, MA. 2018. Organic Farming Practice for Sustainable Agriculture Course Title: Seminar Course Code: AER 598 AUTUMN. s.l., s.e.
- Hudzicki, J. 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information (en línea). *American Society For Microbiology* (December 2009):1-13. Disponible en <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>.
- Hutchison, ML; Harrison, D; Heath, JF; Monaghan, JM. 2017. Fate of *Escherichia coli* O145 present naturally in bovine slurry applied to vegetables before harvest, after washing and simulated wholesale and retail distribution. *Journal of Applied Microbiology* 123(6):1597-1606. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13593>.
- Jacobs, K; Wind, L; Krometis, L-A; Hession, WC; Pruden, A. 2019. Fecal Indicator Bacteria and Antibiotic Resistance Genes in Storm Runoff from Dairy Manure and Compost-Amended Vegetable Plots. *Journal of Environmental Quality* 48(4):1038-1046. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2018.12.0441>.
- Jung, Y; Jang, H; Matthews, KR. 2014. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. s.l., John Wiley and Sons Ltd, vol.7. p. 517-

527 DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>.

Jung, Y; Jang, H; Matthews, KR. 2014. Effect of the food production chain from farm practices to vegetable processing on outbreak incidence. s.l., John Wiley and Sons Ltd, vol.7. p. 517-527 DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12178>.

Kumar, M; Kumar, V. 2017. A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. 3 Biotech 7(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0585-5>.

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>

Lau, CH-F; van Engelen, K; Gordon, S; Renaud, J; Topp, E. 2017. Novel Antibiotic Resistance Determinants From Agricultural Soil Exposed To Antibiotics Widely Used in Human Medicine and Animal Farming. Applied and Environmental Microbiology 83(June):AEM.00989-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00989-17>.

Laxminarayan, R; Duse, A; Wattal, C; Zaidi, AKM; Wertheim, HFL; Sumpradit, N; Vlieghe, E; Hara, GL; Gould, IM; Goossens, H; Greko, C; So, AD; Bigdeli, M; Tomson, G; Woodhouse, W; Ombaka, E; Peralta, AQ; Qamar, FN; Mir, F; Kariuki, S; Bhutta, ZA; Coates, A; Bergstrom, R; Wright, GD; Brown, ED; Cars, O. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. The Lancet infectious diseases 13(12):1057-98. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9).

Leclerc, QJ; Lindsay, JA; Knight, GM. 2019. Mathematical modelling to study the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: Current state of the field and recommendations. s.l., Royal Society Publishing, vol.16. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0260>.

Luna-Guevara, JJ; Arenas-Hernandez, MMP; Martínez De La Peña, C; Silva, JL; Luna-Guevara, ML. 2019. The Role of Pathogenic E. coli in Fresh Vegetables: Behavior, Contamination

Factors, and Preventive Measures. s.l., Hindawi Limited, vol.2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2894328>.

Marti, R; Scott, A; Tien, YC; Murray, R; Sabourin, L; Zhang, Y; Topp, E. 2013. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Applied and Environmental Microbiology* 79(18):5701-5709. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>.

Marti, R; Tien, Y-C; Murray, R; Scott, A; Sabourin, L; Topp, E. 2014. Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure? *Applied and environmental microbiology* 80(10):3258-65. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.00231-14>.

Murray, R; Tien, YC; Scott, A; Topp, E. 2019. The impact of municipal sewage sludge stabilization processes on the abundance, field persistence, and transmission of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes to vegetables at harvest. *Science of the Total Environment* 651:1680-1687. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.030>.

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>.

Nielsen, K; Johnsen, P; Elsas, J. 2019. *Horizontal Gene Transfer and Microevolution in Soil*. s.l., CRC Press. p. 105-123 DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00415>

Povolo, VR; Ackermann, M. 2019. Disseminating antibiotic resistance during treatment. s.l., NLM (Medline), vol.364. p. 737-738 DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aax6620>.

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>.

Pyakurel, S; Bhattarai, B; Rajbhandari, B. 2018. (PDF) Effects of organic nutrient management on

growth and yield of Beetroot (*Beta vulgaris*) and its residual effect on soil (en línea, sitio web). Consultado 4 feb. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/328048172_Effects_of_organic_nutrient_management_on_growth_and_yield_of_Beetroot_Beta_vulgaris_and_its_residual_effect_on_soil.

Ren, F; Sun, N; Xu, M; Zhang, X; Wu, L; Xu, M. 2019. Changes in soil microbial biomass with manure application in cropping systems: A meta-analysis. *Soil and Tillage Research* 194. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.06.008>.

Sarmah, AK; Meyer, MT; Boxall, ABA. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65(5):725-59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>.

Scheinberg, JA; Dudley, EG; Campbell, J; Roberts, B; DiMarzio, M; DebRoy, C; Cutter, CN. 2017. Prevalence and phylogenetic characterization of *Escherichia coli* and hygiene indicator bacteria isolated from leafy green produce, beef, and pork obtained from farmers' markets in Pennsylvania. *Journal of Food Protection* 80(2):237-244. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-282>.

Shah, MS; Eppinger, M; Ahmed, S; Shah, AA; Hameed, A; Hasan, F. 2015. Multidrug-resistant diarrheagenic *E. coli* pathotypes are associated with ready-to-eat salad and vegetables in Pakistan. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58(2):267-273. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13765-015-0019-9>.

Sharma, NC; Kumar, D; Sarkar, A; Chowdhury, G; Mukhopadhyay, AK; Ramamurthy, T. 2020. Prevalence of Multidrug Resistant *Salmonellae* with Increasing Frequency of *Salmonella enterica* Serovars Kentucky and Virchow among Hospitalized Diarrheal Cases in and around Delhi, India (en línea). *Japanese Journal of Infectious Diseases* 73(2):119-123. DOI: <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2019.063>.

Skočková, A; Karpíšková, R; Koláčková, I; Cupáková, Š. 2013. Characteristics of *Escherichia coli*

- from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology* 167(2):196-201. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.011>.
- Sun, M; Ye, M; Jiao, W; Feng, Y; Yu, P; Liu, M; Jiao, J; He, X; Liu, K; Zhao, Y; Wu, J; Jiang, X; Hu, F. 2018. Changes in tetracycline partitioning and bacteria/phage-mediated ARGs in microplastic-contaminated greenhouse soil facilitated by sphorolipid. *Journal of Hazardous Materials* 345:131-139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.11.036>.
- Szczech, M; Kowalska, B; Smolińska, U; Maciorowski, R; Oskiera, M; Michalska, A. 2018. Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology* 286 (August 2017):155-161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018>.
- Tiedje, James M; Wang, F; Manaia, CM; Virta, M; Sheng, Hongjie; Ma, L; Zhan, Tong; Topp, E. 2019. Antibiotic Resistance Genes in the Human-Impacted Environment: A One Health Perspective. *Pedosphere* 29(3):273-282. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60062-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60062-1).
- Tien, YC; Li, B; Zhang, T; Scott, A; Murray, R; Sabourin, L; Marti, R; Topp, E. 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment* 581-582:32-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>.
- Tien, YC; Li, B; Zhang, T; Scott, A; Murray, R; Sabourin, L; Marti, R; Topp, E. 2017. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment* 581-582:32-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>.
- Uhlig, E; Olsson, C; He, J; Stark, T; Sadowska, Z; Molin, G; Ahrné, S; Alsanius, B; Håkansson, Å. 2017. Effects of household washing on bacterial load and removal of *Escherichia coli*

- from lettuce and “ready-to-eat” salads (en línea). *Food Science & Nutrition* 5(6):1215-1220. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.514>.
- 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>.
- van den Bogaard, AE; Stobberingh, EE. 1999. Antibiotic Usage in Animals. *Drugs* 58(4):589-607. DOI: <https://doi.org/10.2165/00003495-199958040-00002>.
- Villa, TG; Feijoo-Siota, L; Sánchez-Pérez, A; Rama, JR; Sieiro, C. 2019. Horizontal Gene Transfer in Bacteria, an Overview of the Mechanisms Involved. s.l., Springer International Publishing. p. 3-76 DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-21862-1_1.
- 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; Nakamura, H; Kage-Nakadai, E; Hara-Kudo, Y; Nishikawa, Y. 2017. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *International Journal of Food Microbiology* 249:44-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003>.
- Wang, WZ; Chi, SL; Xu, WH; Zhang, CL. 2018. Influence of long-term chicken manure application on the concentration of soil tetracycline antibiotics and resistant bacteria variations (en línea). *Applied Ecology and Environmental Research* 16(2):1143-1153. DOI: https://doi.org/10.15666/aeer/1602_11431153.
- Wang, WZ; Chi, SL; Xu, WH; Zhang, CL. 2018. Influence of long-term chicken manure application on the concentration of soil tetracycline antibiotics and resistant bacteria

variations (en línea). *Applied Ecology and Environmental Research* 16(2):1143-1153. DOI: https://doi.org/10.15666/aeer/1602_11431153.

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>

Yaduma, J; Hamisu, H; Mudi, E; Afolayan, S; Idris, B; Yau, M; Usman, N; Alewadolle, S; Shuaibu, S; Jibril, A; Hudu, A; Idris, A; Agaku, T. 2018. Evaluation of Different Rates of Poultry Manure on the Growth and Yield of Ginger (*Zingiber officinale*) (en línea). s.l., s.e. Consultado 5 feb. 2020. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/329175299>.

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>.

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>.

Zhu, Y-G; Johnson, TA; Su, J-Q; Qiao, M; Guo, G-X; Stedtfeld, RD; Hashsham, SA; Tiedje, JM. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(9). DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>.

VI. ANEXOS

6.1. ANEXO A

6.1.1. Fotografía 1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: Cosecha de rábano



Fuente: Autor

6.1.2. Fotografía 2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS: Cosecha de lechuga



Fuente: Autor

6.1.3. Fotografía 3. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato y aplicados gallinaza de compostaje tradicional



Fuente: Autor

6.1.4. Fotografía 4. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato y aplicados gallinaza comercial



Fuente: Autor

6.1.5. Fotografía 5. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Rábanos cultivados en sustrato (testigo)



Fuente: Autor

6.1.6. Fotografía 6. RECEPCIÓN DE MUESTRAS: Lechugas cultivadas en sustrato y aplicadas gallinaza de compostaje tradicional, comercial y sustrato. (De manera ascendente)



Fuente: Autor

6.1.7. Fotografía 7. LAVADO DE MUESTRAS: Para análisis microbiológico, técnicas moleculares



Fuente: Autor

6.1.8. Fotografía 8. LAVADO DE MUESTRAS: Para análisis N-P-K



Fuente: Autor

6.1.9. Fotografía 9. MICROBIOLOGÍA: Preparación de diluciones seriales para realizar cuantificación de microorganismos aerobios en lechuga



Fuente: Autor

6.1.10. Fotografía 10. MICROBIOLOGÍA: Preparación de diluciones seriales para realizar cuantificación de microorganismos aerobios en lechuga



Fuente: Autor

6.1.11. Fotografía 11. MICROBIOLOGÍA: Criopreservación de bacterias aerobias (*E. Coli*) resistentes a antibióticos



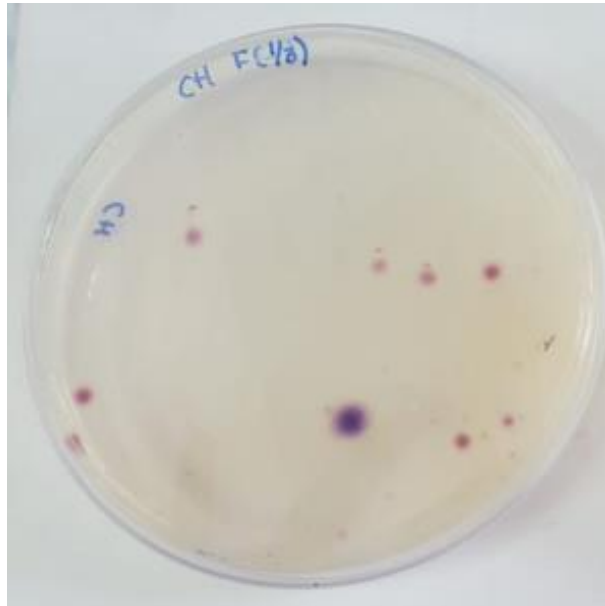
Fuente: Autor

6.1.12. Fotografía 12. MICROBIOLOGÍA: *E. coli* en agar MacConkey.



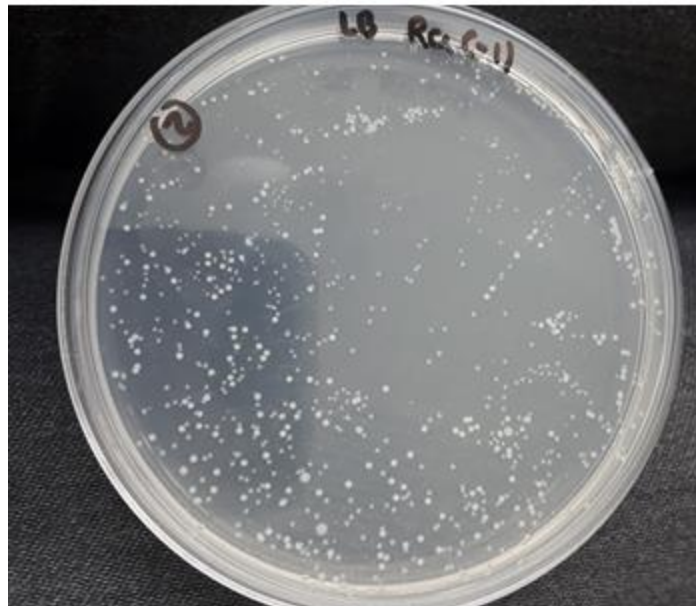
Fuente: Autor

6.1.13. Fotografía 13. MICROBIOLOGÍA: *E. coli* (colonia de color morado) y coliformes (colonias de color rojo) en agar Chromocult.



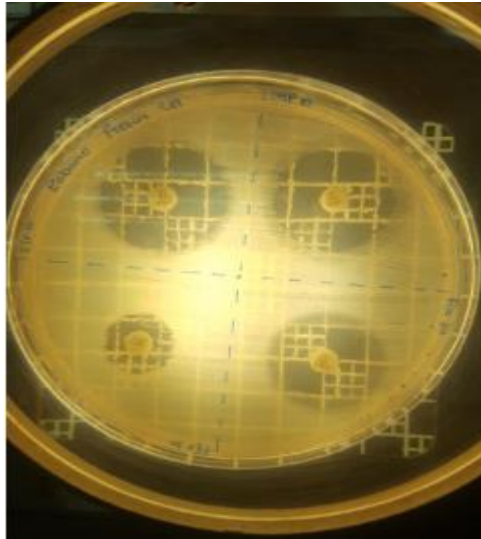
Fuente: Autor

6.1.14. Fotografía 14. MICROBIOLOGÍA: Aerobios en agar LB.



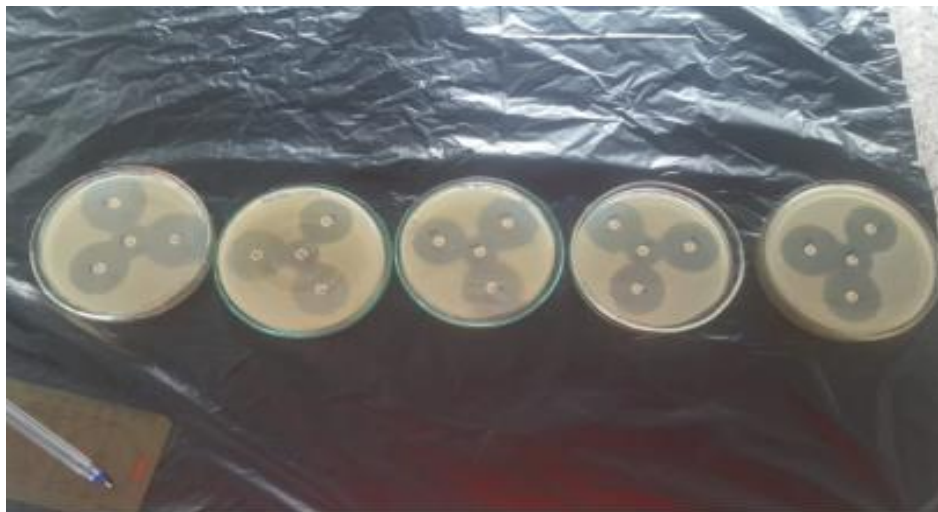
Fuente: Autor

6.1.15. Fotografía 15. MICROBIOLOGÍA: Perfiles de resistencia



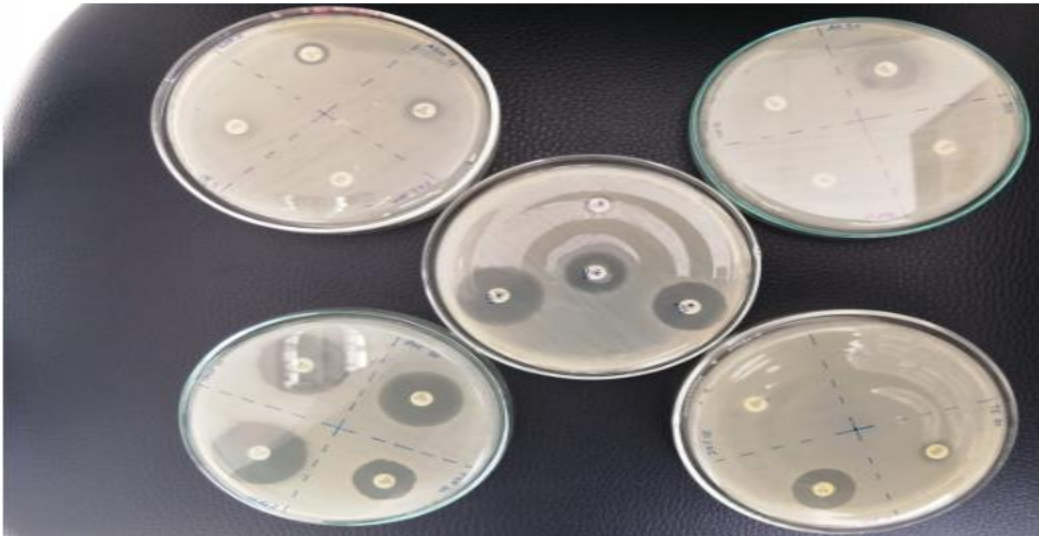
Fuente: Autor

6.1.16. Fotografía 16. MICROBIOLOGÍA: *E.coli* β – lactamasas con los antibióticos Cefepima (FEP30), ceftazidima (CAZ30), ceftriaxona (CRO30) y amoxicilina/ácido clavulánico (AMC30).



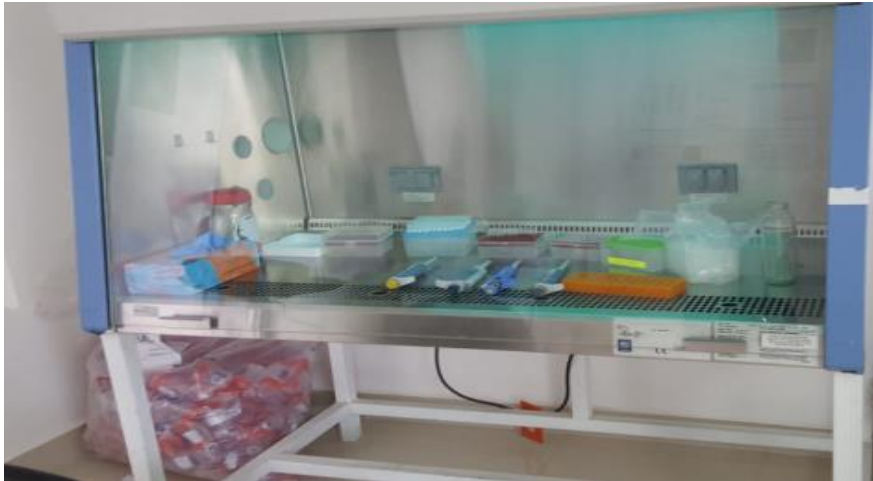
Fuente: Autor

6.1.17. Fotografía 17. CONJUGACIÓN: Antibiograma en placas Mueller – Hinton



Fuente: Autor

6.1.18. Fotografía 18. TÉCNICAS MOLECULARES: Recepción de muestras de DNA, extraídas con el kit para la cuantificación de ARGs.



Fuente: Autor

6.2.ANEXO B.- Densidades microbiológicas sin antibiótico y resistentes a antibióticos (ácido nalidíxico y sulfametoxazol).

6.2.1. Tabla 6.Lechugas aplicadas “Gallinaza de Compostaje Tradicional”

LECHUGA – GALLINAZA DE COMPOSTAJE TRADICIONAL

Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aerobios	1,33E+03	9,49E+02	1,08E+03	1,12E+03	1,93E+02
Resistentes a sulfametoxazol					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aerobios	7,59E+02	6,64E+02	7,91E+02	7,38E+02	6,58E+01
Sin antibiótico					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	8,54E+02	1,08E+03	9,49E+02	9,59E+02	1,11E+02
Coliformes	3,10E+03	3,67E+03	3,00E+03	3,26E+03	3,59E+02
Aerobios	1,58E+03	1,52E+03	1,30E+03	1,47E+03	1,49E+02

Fuente: Autor

6.2.2. **Tabla 7.** Lechugas aplicadas “Gallinaza Comercial”

LECHUGA – GALLINAZA COMERCIAL

Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	3,16E+01	3,16E+01	2,11E+01	1,83E+01
Aerobios	4,20E+03	3,60E+03	3,80E+03	3,87E+03	3,06E+02
Resistentes a sulfametoxazol					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	3,16E+01	0,00E+00	3,16E+01	2,11E+01	1,83E+01
Aerobios	3,00E+03	2,78E+03	2,88E+03	2,89E+03	1,11E+02
Sin antibiótico					
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	1,42E+03	1,20E+03	1,14E+03	1,25E+03	1,49E+02
Aerobios	1,00E+04	1,06E+04	1,12E+04	1,06E+04	6,00E+02

Fuente: Autor

6.2.3. **Tabla 8.** Lechugas en “Sustrato” (TESTIGO)

LECHUGA – Sustrato (TESTIGO)

Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	3,16E+01	3,16E+01	0,00E+00	2,11E+01	1,83E+01
Aerobios	1,96E+03	2,34E+03	2,15E+03	2,15E+03	1,90E+02
Resistentes a Sulfametoxazol					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	2,15E+01	6,32E+01	3,16E+01	3,88E+01	2,18E+01
Aerobios	1,00E+02	3,00E+02	1,00E+02	1,67E+02	1,15E+02
Sin antibiótico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	5,69E+02	4,74E+02	6,96E+02	5,80E+02	1,11E+02

Aerobios	1,10E+04	1,22E+04	1,18E+04	1,17E+04	6,11E+02
-----------------	----------	----------	----------	----------	----------

Fuente: Autor

6.2.4. Tabla 9. Rábanos aplicados “Gallinaza de Compostaje Tradicional”

RÁBANO – Gallinaza de Compostaje Tradicional					
Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00
Coliformes	2,00E+02	1,00E+02	1,00E+02	1,33E+02	5,77E+01
Aerobios	9,30E+03	1,08E+04	1,00E+04	1,00E+04	7,51E+02
Resistentes a Sulfametoxazol					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	3,00E+02	2,00E+02	1,00E+02	2,00E+02	1,00E+02
Coliformes	3,00E+02	2,00E+02	1,00E+02	2,00E+02	1,00E+02
Aerobios	3,19E+03	2,75E+03	2,91E+03	2,95E+03	2,24E+02
Sin antibiótico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	1,00E+03	2,00E+02	8,00E+02	6,67E+02	4,16E+02
Coliformes	1,90E+04	1,52E+04	1,77E+04	1,73E+04	1,93E+03
Aerobios	9,10E+04	7,20E+04	8,20E+04	8,17E+04	9,50E+03

Fuente: Autor

6.2.5. Tabla 10. Rábanos aplicados “Gallinaza Comercial”

RABANO – Gallinaza Comercial					
Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aerobios	3,49E+04	4,44E+04	2,21E+04	3,38E+04	1,12E+04
Resistentes a Sulfametoxazol					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	6,67E+01	5,77E+01
Coliformes	1,00E+02	1,00E+02	0,00E+00	6,67E+01	5,77E+01
Aerobios	1,26E+02	1,90E+02	2,85E+02	2,00E+02	7,96E+01
Sin antibiótico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD

<i>E. coli</i>	2,00E+02	2,00E+02	3,00E+02	2,33E+02	5,77E+01
Coliformes	2,00E+02	2,00E+02	3,00E+02	2,33E+02	5,77E+01
Aerobios	5,20E+03	5,80E+03	6,30E+03	5,77E+03	5,51E+02

Fuente: Autor

6.2.6. Tabla 11. Rábanos en “Sustrato” (TESTIGO)

RÁBANO – Sustrato (TESTIGO)					
Resistentes a Ácido Nalidíxico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aerobios	7,59E+02	9,49E+02	8,54E+02	8,54E+02	9,49E+01
Resistentes a Sulfametoxazol					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Aerobios	1,11E+03	1,01E+03	9,17E+02	1,01E+03	9,49E+01
Sin antibiótico					
	UFC/G	UFC/G	UFC/G	\bar{X}	SD
<i>E. coli</i>	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
Coliformes	6,32E+01	3,16E+01	3,16E+01	4,22E+01	1,83E+01
Aerobios	1,72E+04	1,20E+04	1,20E+04	1,37E+04	3,00E+03

Fuente: Autor

6.3.ANEXO C

6.3.1. Resultados Estadísticos de Microbiología en rábanos cultivados en sustrato y aplicados gallinaza de compostaje tradicional, comercial y testigo (sustrato).

ANOVA

Statistix 10.0
11:44:36

22/01/2020;

Completely Randomized AOV for Ecoli

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	13.1801	6.59004	128.27	0.0000
Error	6	0.3083	0.05138		
Total	8	13.4884			

Grand Mean 1.6978 CV 13.35

Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	3.70	0.0898
O'Brien's Test	1.64	0.2695
Brown and Forsythe Test	1.16	0.3757

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 2.17956
Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	2.7333
2	2.3600
3	0.0000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.1309
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1851

Completely Randomized AOV for EcoliRS

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	7.7441	3.87204	8.34	0.0185
Error	6	2.7843	0.46404		
Total	8	10.5284			

Grand Mean 1.1978 CV 56.87

Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	3.82	0.0850

O'Brien's Test 1.70 0.2601
 Brown and Forsythe Test 0.80 0.4906

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 1.13600
 Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	2.2600
2	1.3333
3	0.0000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.3933
Std Error (Diff of 2 Means)	0.5562

Completely Randomized AOV for EcoliRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	8.00000	4.00000	M	M
Error	6	0.00000	0.00000		
Total	8	8.00000			

Grand Mean 0.6667 CV 0.00

WARNING: The model error mean square is too small to continue.
 The model may fit the data exactly.

Completely Randomized AOV for ColifTota

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	11.0515	5.52574	381.67	0.0000
Error	6	0.0869	0.01448		
Total	8	11.1384			

Grand Mean 2.7322 CV 4.40

Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	2.31	0.1799
O'Brien's Test	1.03	0.4130
Brown and Forsythe Test	0.24	0.7930

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	527.95	0.0001
Error	3.3		

Component of variance for between groups 1.83709
 Effective cell size 3.0

RABANO	Mean
1	4.2367
2	2.3600
3	1.6000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0695
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0982

Completely Randomized AOV for ColifRS

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	7.7441	3.87204	8.34	0.0185
Error	6	2.7843	0.46404		
Total	8	10.5284			

Grand Mean 1.1978 CV 56.87

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.82	0.0850
O'Brien's Test	1.70	0.2601
Brown and Forsythe Test	0.80	0.4906

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 1.13600
 Effective cell size 3.0

RABANO	Mean
1	2.2600
2	1.3333
3	0.0000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.3933
Std Error (Diff of 2 Means)	0.5562

Completely Randomized AOV for ColifRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	8.82000	4.41000	441.00	0.0000
Error	6	0.06000	0.01000		
Total	8	8.88000			

Grand Mean 0.7000 CV 14.29

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	4.00	0.0787
O'Brien's Test	1.78	0.2476
Brown and Forsythe Test	1.00	0.4219

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 1.46667
Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	2.1000
2	0.0000
3	0.0000

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.0577
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0816

Completely Randomized AOV for AerobTotale

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	2.06509	1.03254	245.20	0.0000
Error	6	0.02527	0.00421		
Total	8	2.09036			

Grand Mean 4.2678 CV 1.52

Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	2.09	0.2048
O'Brien's Test	0.93	0.4453
Brown and Forsythe Test	0.18	0.8435

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	411.12	0.0000
Error	3.7		

Component of variance for between groups 0.34278
Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	4.9100
2	3.7600
3	4.1333

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.0375
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0530

Completely Randomized AOV for AerobRS

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	2.15882	1.07941	96.38	0.0000
Error	6	0.06720	0.01120		

Total 8 2.22602

Grand Mean 2.9156 CV 3.63

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		3.61	0.0936
O'Brien's Test		1.60	0.2769
Brown and Forsythe Test		2.24	0.1872

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	134.80	0.0005
Error	3.4		

Component of variance for between groups 0.35607
Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	3.4667
2	2.2767
3	3.0033
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0611
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0864

Completely Randomized AOV for AerobRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
RABANO	2	3.90140	1.95070	208.26	0.0000
Error	6	0.05620	0.00937		
Total	8	3.95760			

Grand Mean 3.8133 CV 2.54

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		3.44	0.1010
O'Brien's Test		1.53	0.2906
Brown and Forsythe Test		1.61	0.2747

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
RABANO	2.0	452.88	0.0001
Error	3.4		

Component of variance for between groups 0.64711
Effective cell size 3.0

RABANO Mean

1	4.0000
2	4.5100
3	2.9300
Observations per Mean	3

Standard Error of a Mean 0.0559
Std Error (Diff of 2 Means) 0.0790

PRUEBA DE MEDIAS

P 0.05

Statistix 10.0
11:54:37

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Ecoli by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	2.7333	A
2	2.3600	A
3	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1851
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.5681
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 by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	2.2600	A
2	1.3333	AB
3	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5562
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 1.7075
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 by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	4.2367	A
2	2.3600	B
3	1.6000	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0982
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.3016
All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRS by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	2.2600	A
2	1.3333	AB
3	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5562
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 1.7075
 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 ColifRAN by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	2.1000	A
2	0.0000	B
3	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0816
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.2507
 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 AerobTotale by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	4.9100	A
3	4.1333	B
2	3.7600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0530
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.1627
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of AerobRS by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
1	3.4667	A
3	3.0033	B
2	2.2767	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0864
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.2653
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of AerobAN by RABANO

RABANO	Mean	Homogeneous Groups
2	4.5100	A
1	4.0000	B
3	2.9300	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0790
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.2426
 All 3 means are significantly different from one another.

DESCRIPTIVOS

Statistix 10.0
11:55:26

22/01/2020;

Breakdown for Ecoli

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	2.7333	0.3786
RABANO	2	2.3600	0.1039
RABANO	3	0.0000	0.0000
Overall		1.6978	1.2985

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRS

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	2.2600	0.2425
RABANO	2	1.3333	1.1547
RABANO	3	0.0000	0.0000
Overall		1.1978	1.1472

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRAN

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	2.0000	0.0000
RABANO	2	0.0000	0.0000
RABANO	3	0.0000	0.0000
Overall		0.6667	1.0000

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifTota

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	4.2367	0.0513
RABANO	2	2.3600	0.1039
RABANO	3	1.6000	0.1732
Overall		2.7322	1.1800

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRS

Variable	Level	Mean	SD
----------	-------	------	----

RABANO	1	2.2600	0.2425
RABANO	2	1.3333	1.1547
RABANO	3	0.0000	0.0000
Overall		1.1978	1.1472

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRAN

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	2.1000	0.1732
RABANO	2	0.0000	0.0000
RABANO	3	0.0000	0.0000
Overall		0.7000	1.0536

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobTotale

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	4.9100	0.0500
RABANO	2	3.7600	0.0400
RABANO	3	4.1333	0.0924
Overall		4.2678	0.5112

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobRS

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	3.4667	0.0306
RABANO	2	2.2767	0.1750
RABANO	3	3.0033	0.0451
Overall		2.9156	0.5275

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobRAN

Variable	Level	Mean	SD
RABANO	1	4.0000	0.0300
RABANO	2	4.5100	0.1572
RABANO	3	2.9300	0.0500
Overall		3.8133	0.7033

Cases Included 9 Missing Cases 0

6.3.2. Análisis Estadísticos de lechugas cultivadas en sustrato y aplicadas gallinaza de compostaje tradicional, comercial y testigo (sustrato).

ANOVA

Statistix 10.0
11:56:31

22/01/2020;

Completely Randomized AOV for Ecoli

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	17.7608	8.88040	10656.48	0.0000
Error	6	0.0050	0.00083		
Total	8	17.7658			

Grand Mean 0.9933 CV 2.91

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	4.00	0.0787
O'Brien's Test	1.78	0.2476
Brown and Forsythe Test	4.00	0.0787

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 2.95986
Effective cell size 3.0

LECHUGA	Mean
1	2.9800
2	0.0000
3	0.0000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0167
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0236

Completely Randomized AOV for EcoliRS

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	0.00000	0.00000	M	M
Error	6	0.00000	0.00000		
Total	8	0.00000			

Grand Mean 0.0000 CV M

WARNING: The total sum of squares is too small to continue.
The dependent variable may be nearly constant.

Completely Randomized AOV for EcoliRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	0.00000	0.00000	M	M
Error	6	0.00000	0.00000		
Total	8	0.00000			

Grand Mean 0.0000 CV M

WARNING: The total sum of squares is too small to continue.
The dependent variable may be nearly constant.

Completely Randomized AOV for ColifTota

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	0.84669	0.42334	120.57	0.0000
Error	6	0.02107	0.00351		
Total	8	0.86776			

Grand Mean 3.1222 CV 1.90

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.52	0.2919
O'Brien's Test		0.68	0.5433
Brown and Forsythe Test		0.39	0.6928

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	106.75	0.0004
Error	3.8		

Component of variance for between groups 0.13994
Effective cell size 3.0

LECHUGA	Mean
1	3.5100
2	3.0967
3	2.7600
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0342
Std Error (Diff of 2 Means)	0.0484

Completely Randomized AOV for ColifRS

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	3.72042	1.86021	6.92	0.0277
Error	6	1.61327	0.26888		
Total	8	5.33369			

Grand Mean 0.6811 CV 76.13

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		3.70	0.0898

O'Brien's Test 1.64 0.2695
 Brown and Forsythe Test 0.76 0.5072

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 0.53044
 Effective cell size 3.0

LECHUGA Mean

1	0.0000
2	0.5000
3	1.5433
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.2994
Std Error (Diff of 2 Means)	0.4234

Completely Randomized AOV for ColifRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	3.67709	1.83854	6.84	0.0284
Error	6	1.61327	0.26888		
Total	8	5.29036			

Grand Mean 0.8478 CV 61.16

Homogeneity of Variances

	F	P
Levene's Test	3.70	0.0898
O'Brien's Test	1.64	0.2695
Brown and Forsythe Test	0.76	0.5072

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 0.52322
 Effective cell size 3.0

LECHUGA Mean

1	0.0000
2	1.0000
3	1.5433
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.2994
Std Error (Diff of 2 Means)	0.4234

Completely Randomized AOV for AerobTotale

Source	DF	SS	MS	F	P
--------	----	----	----	---	---

LECHUGA	2	1.56296	0.78148	669.84	0.0000
Error	6	0.00700	0.00117		
Total	8	1.56996			

Grand Mean 3.7522 CV 0.91

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		1.77	0.2490
O'Brien's Test		0.79	0.4975
Brown and Forsythe Test		0.30	0.7500

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	392.28	0.0000
Error	3.8		

Component of variance for between groups 0.26010
Effective cell size 3.0

LECHUGA Mean

1	3.1633	
2	4.0267	
3	4.0667	
Observations per Mean		3
Standard Error of a Mean		0.0197
Std Error (Diff of 2 Means)		0.0279

Completely Randomized AOV for HetRS

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	2.54142	1.27071	48.30	0.0002
Error	6	0.15787	0.02631		
Total	8	2.69929			

Grand Mean 2.8289 CV 5.73

Homogeneity of Variances		F	P
Levene's Test		3.89	0.0826
O'Brien's Test		1.73	0.2554
Brown and Forsythe Test		0.76	0.5078

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	227.06	0.0004
Error	3.2		

Component of variance for between groups 0.41480
Effective cell size 3.0

LECHUGA Mean

1	2.8667
2	3.4600

3 2.1600
 Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0937
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1324

Completely Randomized AOV for AerobRAN

Source	DF	SS	MS	F	P
LECHUGA	2	3.11087	1.55543	56.38	0.0001
Error	6	0.16553	0.02759		
Total	8	3.27640			

Grand Mean 2.9300 CV 5.67

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	3.69	0.0903
O'Brien's Test	1.64	0.2705
Brown and Forsythe Test	0.63	0.5656

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
LECHUGA	2.0	89.71	0.0018
Error	3.1		

Component of variance for between groups 0.50928
 Effective cell size 3.0

LECHUGA	Mean
1	3.0433
2	3.5867
3	2.1600
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0959
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1356

PRUEBA DE MEDIAS

Statistix 10.0
 11:58:12

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Ecoli by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
1	2.9800	A
2	0.0000	B
3	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0236
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.0724
 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 by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
1	3.5100	A
2	3.0967	B
3	2.7600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0484
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.1485
All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ColifRS by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
3	1.5433	A
2	0.5000	AB
1	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4234
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 1.2997
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 ColifRAN by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
3	1.5433	A
2	1.0000	AB
1	0.0000	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.4234
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 1.2997
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 AerobTotale by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
3	4.0667	A
2	4.0267	A
1	3.1633	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0279
Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.0856
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 AerobRS by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
---------	------	--------------------

2	3.4600	A
1	2.8667	B
3	2.1600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1324
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.4066
 All 3 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of AerobRAN by LECHUGA

LECHUGA	Mean	Homogeneous Groups
2	3.5867	A
1	3.0433	B
3	2.1600	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1356
 Critical Q Value 4.341 Critical Value for Comparison 0.4163
 All 3 means are significantly different from one another.

DESCRIPTIVOS

Statistix 10.0
 11:58:36

22/01/2020;

Breakdown for Ecoli

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	2.9800	0.0500
LECHUGA	2	0.0000	0.0000
LECHUGA	3	0.0000	0.0000
Overall		0.9933	1.4902

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRS

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	0.0000	0.0000
LECHUGA	2	0.0000	0.0000
LECHUGA	3	0.0000	0.0000
Overall		0.0000	0.0000

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for EcoliRAN

Variable	Level	Mean	SD
----------	-------	------	----

LECHUGA	1	0.0000	0.0000
LECHUGA	2	0.0000	0.0000
LECHUGA	3	0.0000	0.0000
Overall		0.0000	0.0000

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifTota

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	3.5100	0.0436
LECHUGA	2	3.0967	0.0473
LECHUGA	3	2.7600	0.0800
Overall		3.1222	0.3293

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRS

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	0.0000	0.0000
LECHUGA	2	0.5000	0.8660
LECHUGA	3	1.5433	0.2380
Overall		0.6811	0.8165

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for ColifRAN

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	0.0000	0.0000
LECHUGA	2	1.0000	0.8660
LECHUGA	3	1.5433	0.2380
Overall		0.8478	0.8132

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobTotale

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	3.1633	0.0473
LECHUGA	2	4.0267	0.0252
LECHUGA	3	4.0667	0.0252
Overall		3.7522	0.4430

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobRS

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	2.8667	0.0416
LECHUGA	2	3.4600	0.0200
LECHUGA	3	2.1600	0.2771
Overall		2.8289	0.5809

Cases Included 9 Missing Cases 0

Breakdown for AerobRAN

Variable	Level	Mean	SD
LECHUGA	1	3.0433	0.0709
LECHUGA	2	3.5867	0.0306
LECHUGA	3	2.1600	0.2771
Overall		2.9300	0.6400

Cases Included 9 Missing Cases 0

6.3.3. Análisis Estadísticos de genes de resistencia en rábanos y lechugas cultivados en sustrato y aplicados gallinaza de compostaje tradicional, comercial y testigo (sustrato).

➤ **Gen *bla*_{TEM} en Lechuga**

ANOVA

Statistix 10.0
12:03:17

22/01/2020;

Completely Randomized AOV for Fresca

Source	DF	SS	MS	F	P
Trat	2	16.7059	8.35293	337.14	0.0000
Error	6	0.1487	0.02478		
Total	8	16.8545			

Grand Mean 0.9634 CV 16.34

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	4.00	0.0787
O'Brien's Test	1.78	0.2476
Brown and Forsythe Test	1.62	0.2739

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trat	2.0	M	M
Error	M		

Component of variance for between groups 2.77605
Effective cell size 3.0

Trat	Mean
1	0.0000
2	2.8901
3	0.0000
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	0.0909
Std Error (Diff of 2 Means)	0.1285

Prueba de Medias

Statistix 10.0
12:02:05

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Fresca by Trat

Trat	Mean	Homogeneous Groups
2	2.8901	A
1	0.0000	B
3	0.0000	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.1285
 Critical Q Value 6.341 Critical Value for Comparison 0.5763
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Descriptivos

Statistix 10.0
 12:03:38

22/01/2020;

Breakdown for Fresca

Variable	Level	Mean	SD
Trat	1	0.0000	0.0000
Trat	2	2.8901	0.2726
Trat	3	0.0000	0.0000
Overall		0.9634	1.4515

Cases Included 9 Missing Cases 0

➤ Gen *bla*_{TEM} en rábano (No paramétrica kruskal wallis)

Statistix 10.0
 12:07:27

22/01/2020;

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV for gen by Tratam

Tratam	Mean Rank	Sample Size
1	10.5	6
2	9.0	6
3	9.0	6
Total	9.5	18

Kruskal-Wallis Statistic, corrected for ties 12.67
 P-Value, Using Beta Approximation 0.0000
 P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0018

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	9.0000	4.50000	1.00	0.3911
Within	15	67.5000	4.50000		

Total 17 76.5000

Total number of values that were tied 17
Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 18 Missing Cases 0
Statistix 10.0
12:07:48

22/01/2020;

Breakdown for gen

Variable	Level	Mean	SD
Tratam	1	0.4291	1.0511
Tratam	2	0.0000	0.0000
Tratam	3	0.0000	0.0000
Overall		0.1430	0.6068

Cases Included 18 Missing Cases 0
Statistix 10.0
12:06:26

22/01/2020;

Dunn's All-Pairwise Comparisons Test of gen by Tratam

Tratam	Mean Rank	Homogeneous Groups
1	10.50	A
2	9.00	A
3	9.00	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.2247
Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 2.9320
There are no significant pairwise differences among the means.

➤ Gen *sull* en rábano

ANOVA

Statistix 10.0
8:11:59

22/01/2020;

Completely Randomized AOV for Sull

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratam	2	7.8899	3.94495	5.17	0.0196
Error	15	11.4542	0.76361		
Total	17	19.3441			

Grand Mean 3.2021 CV 27.29

Homogeneity of Variances	F	P
--------------------------	---	---

Levene's Test	1.16	0.3391
O'Brien's Test	0.92	0.4201
Brown and Forsythe Test	0.85	0.4468

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Tratam	2.0	3.61	0.0727
Error	8.6		

Component of variance for between groups 0.53022
 Effective cell size 6.0

Tratam	Mean
1	3.9653
2	3.2901
3	2.3508
Observations per Mean	6
Standard Error of a Mean	0.3567
Std Error (Diff of 2 Means)	0.5045

Prueba de medias

Statistix 10.0
 8:11:00

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Sull1 by Tratam

Tratam	Mean	Homogeneous Groups
1	3.9653	A
2	3.2901	AB
3	2.3508	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5045
 Critical Q Value 3.675 Critical Value for Comparison 1.3110
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

Descriptivos estadísticos

Statistix 10.0
 8:12:30

22/01/2020;

Breakdown for Sull1

Variable	Level	Mean	SD	SE
Tratam	1	3.9653	0.7899	0.3225
Tratam	2	3.2901	0.4238	0.1730
Tratam	3	2.3508	1.2195	0.4979
Overall		3.2021	1.0667	0.2514

Cases Included 18 Missing Cases 0

➤ **Gen *sull* en lechuga**

ANOVA

Statistix 10.0
8:16:47

22/01/2020;

Completely Randomized AOV for *sull*

Source	DF	SS	MS	F	P
Trata	2	5.72980	2.86490	38.62	0.0004
Error	6	0.44514	0.07419		
Total	8	6.17494			

Grand Mean 5.3928 CV 5.05

Homogeneity of Variances	F	P
Levene's Test	2.95	0.1279
O'Brien's Test	1.31	0.3365
Brown and Forsythe Test	0.89	0.4584

Welch's Test for Mean Differences

Source	DF	F	P
Trata	2.0	93.76	0.0017
Error	3.1		

Component of variance for between groups 0.93024
Effective cell size 3.0

Trata	Mean
1	5.6908
2	6.1864
3	4.3013

Observations per Mean 3
Standard Error of a Mean 0.1573
Std Error (Diff of 2 Means) 0.2224

Prueba De medias

Statistix 10.0
8:17:54

22/01/2020;

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of *sull* by Trata

Trata	Mean	Homogeneous Groups
2	6.1864	A
1	5.6908	A
3	4.3013	B

Alpha 0.01 Standard Error for Comparison 0.2224

Critical Q Value 6.341 Critical Value for Comparison 0.9972
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

Descriptivos

Statistix 10.0
8:18:22

22/01/2020;

Breakdown for sull

Variable	Level	Mean	SD	SE
Trata	1	5.6908	0.4190	0.2419
Trata	2	6.1864	0.0791	0.0456
Trata	3	4.3013	0.2018	0.1165
Overall		5.3928	0.8786	0.2929

Cases Included 9 Missing Cases 0

6.4.ANEXO D.- Análisis del porcentaje de N - P – K de rábanos y lechugas aplicadas gallinaza de compostaje tradicional, gallinaza comercial y testigo (sustrato).

6.4.1. Tabla 12. Análisis N – P – K de rábanos

MUESTRA	%N	%P	%K
Sustrato	2,04	1,02	3,44
Gallinaza Comercial	2,91	1,27	4,54
Gallinaza Compostaje Tradicional	2,12	1,17	3,59

Fuente: Autor

6.4.2. Tabla 13. Análisis N – P – K de lechugas

MUESTRA	%N	%P	%K
Sustrato	1,28	0,04	0,99
Gallinaza Comercial	4,46	0,70	2,05
Gallinaza Compostaje Tradicional	4,47	0,10	0,58

Fuente: Autor

6.4.3. Tabla 14. Información del parámetro analizado

Parámetro Analizado	Método	Equipo
Nitrógeno Total	Kjedahl	Micro- Kjedahl
Fósforo	Colorimétrico	Espectofotómetro Genesys 20
Potasio	Digestión Total Ácida	Espectofotómetro de A.A Perkin Elmer 100

Fuente: Autor