



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



Tema: Persistencia de genes de resistencia a antibióticos e indicadores de contaminación fecal durante el compostaje tradicional de gallinaza

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

El estudio es parte del proyecto: “EVALUACIÓN DE LA DISEMINACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS POR MEDIO DEL ESTIERCOL DE LA GALLINAZA” aprobado por el Honorable Consejo Universitario y financiado por La Dirección de Investigación y Desarrollo DIDE de la Universidad Técnica de Ambato. Resolución, **0192-CU-P-2017**.

AUTOR: Álvarez Cortez Franklin Andrés

TUTOR: Quim. William Calero Cáceres, PhD

Ambato – Ecuador

Enero 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

CERTIFICA

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

Ambato, 17/08/2020

PhD. William Ricardo Calero Cáceres

C.I. 171434885-9

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Franklin Andrés Álvarez Cortez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Franklin Andrés Álvarez Cortez

C.I. 18004369930

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Presiente de Tribunal

Mg. Mario Daniel García Solís

C.I.: 1103605471

Dr. David Andrés Terán Mera

C.I.: 1716569726

Ambato, 27 de agosto del 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Franklin Andrés Álvarez Cortez

C.I. 18004369930

AUTOR

DEDICATORIA

*Este trabajo de investigación se lo dedico
Franklin Alvarez y Cecilia Cortez, quienes
han cumplido con el rol de padre y madre,
por apoyarme en todo momento, con paciencia
y sabiduría supieron darme los consejos
oportunos cuando más lo necesitaba,
esto es un reflejo del amor que me entregaron.*

*A mis hermanos, Sebastian y Juan José, quienes
supieron demostrarme el apoyo incondicional
de hermanos y sobre todo que de ellos puedo
aprender mucho, han estado junto a mí a cada
instante dándome alegrías y una gran compañía.*

*A mis abuelitos Piedad y Alberto que con su sabiduría
y gran amor me enseñaron día a día el valor
de la familia y tomar las decisiones adecuadas.*

Esto es por y para ustedes.

Con mucho amor y cariño Andrés

AGRADECIMIENTOS

“Intenta y falla, pero nunca falles en intentarlo”

En incontables ocasiones tuve presente el día en que llegaría este momento, con alegría, con sentimientos encontrados y con la satisfacción de cumplir una meta de muchas, la superación viene del deseo profundo y de las ganas de jamás rendirse ante ninguna adversidad, en este momento me atraviesa una nostalgia del saber que todo esfuerzo ha valido la pena y que pude disfrutar del camino gracias a muchas personas que me dejaron una enseñanza y que todas las enseñanzas me dejaron varias experiencias y que todas las experiencias dejaron una gran huella.

Comenzare agradeciendo a mis padres, por estar siempre junto a mí, brindándome su apoyo, comprensión y cariño para afrontar cada etapa de mi vida, sin los cuales no hubiese sido posible alcanzar mis metas y sueños, me dieron el valor de la constancia del amor a nuestras propias decisiones que con gran responsabilidad todo es posible.

Mis queridos hermanos, mis enanos, que, con sus bromas, sus locuras y con ese amor incondicional forjado por nuestros padres, nos supieron inculcar el valor de la lealtad de un hermano y no importa las condiciones en las que estemos siempre sé que cuento con ellos en cada momento de mi vida,

A toda mi familia, en especial a mis abuelitos por sus grandes consejos y sus bendiciones, a mi tía Poly, que nunca dejo de apoyarme hasta en los peores momentos con sus sabias palabras y sus detalles inesperados que siempre me sacan muchas alegrías.

Como olvidar a esa mujer que siempre estuvo a mi lado en todas las pruebas dentro de mi vida universitaria, en mis derrotas y mis triunfos, en salud o enfermedad con

*ese corazón tan noble que te caracteriza te doy las gracias **Carolina** de no ser por tu apoyo incondicional esto no hubiese sido posible.*

*A mi Tutor de Investigación, **Dr. William Calero**, por la confianza y paciencia depositada en mí, por su dedicación y orientación que lo identifican como un verdadero profesional y han hecho posible la culminación de este trabajo, y como no agradecer por formar parte de ese notable equipo de investigación “UTA RAM One Health”*

*A la Universidad Técnica de Ambato, especialmente a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, que me ha dado la oportunidad de formarme en sus aulas y ha contribuido en mi formación profesional y humana a través de su destacado personal docente. A la **Ing. Jaqueline Ortiz** por esa amistad y ese apoyo irremplazable, sin duda una excelente persona.*

*También agradecer a mis verdaderos amigos, **Luchito, Bolo, Ely** y en especial a **Maju** que durante este camino me brindaron su lealtad, su confianza y esa amistad tan especial que con mucho sacrificio, esfuerzo y dedicación hemos compartido muchas experiencias dentro y fuera del aula.*

Sin duda agradecer a todas las personas que formaron parte de este proceso, porque tuve la oportunidad de conocer a lindas personas durante este arduo camino, aprendí que la vida siempre nos va a poner muchos obstáculos, pero los límites solo nosotros, y para alcanzar el éxito no se necesita superar a los demás si no a nosotros mismo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR	II
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	III
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	IV
DERECHOS DE AUTOR	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT.....	XIV

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1	Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1	Generalidades.....	1
1.1.2	Indicadores de contaminación fecal en abonos orgánicos	3
1.1.2.1	Escherichia coli.....	3
1.1.2.2	Coliformes Totales.....	4
1.1.2.3	Colifagos Somáticos	4
1.1.3	PCR en tiempo real para detección de ARGs	5
1.2	Objetivos	7
1.2.1	Objetivos General	7
1.2.2	Objetivos Específicos.....	7
1.3	Hipótesis	7

CAPITULO II

METODOLOGIA

2.1.	Materiales y Equipos.....	8
2.1.1	Equipos	8
2.1.2	Materiales.....	8
2.1.3	Reactivos.....	9
2.1.4	Insumos	10
2.2.	Métodos.....	10
2.2.1	Trabajo de Campo.....	10

2.2.1.1	Ubicación de la zona de ensayo	10
2.2.2	Preparación del compostaje de gallinaza	11
2.2.3	Recolección de las muestras	11
2.2.4	Trabajo de Laboratorio.....	12
2.2.4.1	Recuento de Escherichia coli y de bacterias coliformes	12
2.2.4.2	Recuento de bacteriófagos	13
2.2.4.3	Protocolo de aislamiento de ADN de heces para la detección de patógenos (Quiagen, 2014).	14
2.2.4.4	Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica TaqMan para los genes sul1, blaTEM, tet(W), qnrS y 16S rADN (Valle & Calero, 2019)	15
2.2.4.5	Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica SYBR-Green para el gen ermB (Valle & Calero, 2019)	17
2.2.4.6	Condiciones de reacción qPCR.....	17
2.2.4.7	Cinética de Inactivación de Indicadores Microbiológicos y Moleculares, Valor D 20	

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Análisis y discusión de los resultados	21
3.1.1.	Verificación de Hipótesis.....	40

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.	Conclusiones	41
4.2.	Recomendaciones.....	42

BIBLIOGRAFÍA	43
---------------------------	-----------

ANEXOS.....	49
--------------------	-----------

Anexo A. Valores de los ensayos de qPCR realizados en las muestras de gallinaza.....	49
--	----

Anexo B. Análisis Estadista ANOVA	63
---	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equipos de Laboratorio	8
Tabla 2. Materiales de Laboratorio	8
Tabla 3. Reactivos de Laboratorio	9
Tabla 4. Insumos de Laboratorio	10
Tabla 5. Variedades de compostaje del estiércol de gallina.....	11
Tabla 6. Protocolo de qPCR con sondas TaqMan	16
Tabla 7. Protocolo qPCR SYBR Green	17
Tabla 8. Condiciones de reacciones de PCR cuantitativa (qPCR).....	18
Tabla 9. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (Sybr).....	18
Tabla 10. Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR)	19
Tabla 11. Resumen de los indicadores microbiológicos y moleculares para cada tratamiento evaluado.	22
Tabla 12. Parámetro cinético de inactivación térmica de los indicadores microbiológicos y moleculares en los diferentes tratamientos de compostaje de gallinaza	38
Tabla 13. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza fresca sin aditivo.....	49
Tabla 14. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con cal	52
Tabla 15. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con tamo.....	56
Tabla 16. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con bacterias	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del lugar del Ensayo en el Cantón Quero	10
Figura 2. Placa de qPCR Thermo Fisher Scientific.	16
Figura 3. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento fresca (T1).....	24
Figura 4. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con cal (T2) durante 49 días de compostaje.....	25
Figura 5. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con tamo (T3) durante 49 días de compostaje.	26
Figura 6. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con bacterias (T4) durante 49 días de compostaje.....	27
Figura 7. Inactivación térmica de la gallinaza fresca sin aditivo (T1) durante 49 días de compostaje.....	31
Figura 8. Inactivación térmica de la gallinaza con cal (T2) durante 49 días de compostaje.....	33
Figura 9. Inactivación térmica de la gallinaza con tamo (T3) durante 49 días de compostaje.....	35
Figura 10. Inactivación térmica de la gallinaza con bacterias (T4) durante 49 días de compostaje.....	37

RESUMEN

A nivel mundial, el sector pecuario representa el principal consumidor de antibióticos; utilizados principalmente para prevenir y tratar infecciones de animales. El estiércol animal compostado es uno de los principales recursos utilizados por agricultores orgánicos, ya que representa una fuente de nutrientes ideal para suelos de cultivo. Se ha comprobado que el estiércol de las gallinas puede portar grandes cantidades de bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs).

En esta investigación se evaluó la persistencia de los genes de resistencia a antibióticos (*sul1*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *ermB* y *tetW*), por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y del gen 16S rDNA en muestras del compostaje del estiércol de la gallina durante los 49 días; el gen con mayor abundancia fue el gen de resistencia a betalactámicos *bla_{TEM}* en los tratamientos T1 (sin aditivo) T2 (cal) y T4 (bacterias); mientras que en el tratamiento T3 (tamo) fue el gen *qnrS*, también se evaluó los indicadores de contaminación fecal durante el mismo tiempo, en el caso de *E. coli* se presentó una mayor resistencia hasta el día 21, los coliformes totales presentaron densidades elevadas de microorganismos y una resistencia hasta el día 28; mientras que los bacteriófagos mostraron una elevada resistencia que superó los 49 días de compostaje. Por tanto, se establece que la gallinaza presenta genes de resistencia en varios tratamientos de compostaje y densidades elevadas de bacteriófagos que afectan el medio ambiente, la cual merece una atención prioritaria y estudios complementarios en el uso de abonos orgánicos.

Palabras claves: Genes de resistencia, genes bacterianos, compostaje, gallinaza, abonos orgánicos

ABSTRACT

Globally, the livestock industry represents the principal consumer of antibiotics, mainly used to prevent and treat animal infections. Composted animal manure is one of the most principal resources used by organic farmers because it represents an ideal nutrient source for farming soils. It has been found that hen manure contains a large number of bacteria resistant to (ARBs) antibiotics and resistant-genes to (ARGs) antibiotics.

This research project assessed the persistence of antibiotic resistance genes (*sull*, *blaTEM*, *qnrS*, *ermB*, and *tetW*), through quantitative PCR (qPCR) and gene 16S rDNA in hen manure composting samples during 49 days; the most abundant gene was the *blaTEM* beta-lalatomic resistance gene in the T1 (non-additive) T2 (cal) and T4 (bacteria) treatments; while the T3 (tamo) treatment was the *qnrS* gene, indicators of fecal contamination were also evaluated during the same time, In the case of *E.coli* there was raised resistance until day 21, total coliforms has high densities microorganisms and resistance until day 28; while bacteriophages showed high resistance that surpassed the 49 days of composting. Consequently, this project establishes that poultry manure has resistance genes in several composing treatments and high densities of bacteriophages affecting the environment, which deserves precedence attention and complementary researches in the use of organic fertilizers.

Key words: Resistant-genes, bacterial genes, composting, poultry manure, organic fertilizers.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Generalidades

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno biológico que se produce de forma natural en los microorganismos, y que conlleva una modificación negativa en la eficacia de los antibióticos sobre éstos. El uso inapropiado de los antibióticos provocan una presión selectiva sobre las poblaciones microbianas, acelerando los procesos evolutivos que favorecen el apareamiento de nuevos mecanismos de resistencia antibiótica (**San Millan, 2018**). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la emergencia de la resistencia antimicrobiana representará uno de las principales causas de mortalidad en este siglo (**Périchon et al., 2019**).

A nivel mundial, el sector pecuario representa el principal consumidor de antibióticos; utilizados principalmente para prevenir y tratar infecciones de animales, así como por su efecto como promotores del crecimiento y como suplemento alimenticio, por su efecto mejorador de la eficiencia del pienso (**Economou & Gousia, 2015a**). En países desarrollados, existe un elevado control sobre el uso de este tipo de compuestos en el sector pecuario, limitando su aplicación fuera de la terapéutica (**Robinson et al., 2016**). Sin embargo, en países como Ecuador, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento sigue siendo permitido. Considerando la elevada persistencia ambiental que presentan estos compuestos, y su influencia en la modificación de las poblaciones microbianas en diferentes ecosistemas, los convierte en un estresor ambiental con considerable actividad biológica (**Cytryn, 2013**).

Las principales fuentes de diseminación de antibióticos y de bacterias resistentes son las aguas residuales humanas y animales. De acuerdo a estudios metabólicos, entre el 40% y 90% de la cantidad de la mayoría de antibióticos son excretadas en su estructura

parental (**Pikkemaat et al., 2016**). Otro de los principales reservorios de antibióticos y de resistencias a antibióticos son los lodos de depuradora y los estiércoles de origen animal, los cuales han sido históricamente aplicados en procesos de enmienda de suelos (**Calero-Cáceres et al., 2014; Cytryn, 2013; Tien et al., 2017**).

Los antibióticos más comúnmente utilizados en el sector agrícola y veterinario son las penicilinas (amoxicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (doxiciclina, oxitetraciclina), macrólidos (eritromicina, tilosina), aminoglucósidos, sulfonamida/trimetoprima, polimixinas (colistina) y antimicrobianos (tiamulina) (**Economou & Gousia, 2015b**). El uso de agentes antimicrobianos veterinarios en animales de granja y en la agricultura representa un problema potencial de salud pública y ambiental, por lo cual se ha hecho un llamado a limitar su uso, con el fin de reducir la evolución y dispersión de nuevos ARBs (bacterias resistentes a antibióticos) y ARGs (genes de resistencia a antibióticos) en diferentes ecosistemas (**Woolhouse et al., 2015**).

Los abonos orgánicos son una importante alternativa de fertilización edáfica ya que suplen las necesidades biológicas del suelo, poseen propiedades fisicoquímicas que mejoran e incrementan la producción de cultivos (**Marti et al., 2013**). Sin embargo, a pesar de su beneficio potencial para la agricultura, existe suficiente evidencia científica del aumento en contenido de metales pesados, patógenos y residuos de antibióticos veterinarios, que puede llevar a una proliferación de bacterias resistentes a los antimicrobianos en los suelos enmendados con estiércol animal (**Rodríguez et al., 2019**).

En los traspatios de las comunidades rurales en Ecuador, y particularmente en diversos sectores agrícolas de la zona andina, se liberan y acumulan diferentes estiércoles en los terrenos cercanos a las casas o unidades habitacionales. Estos estiércoles ocasionan varios impactos ambientales como malos olores, contaminación de aguas, suelo y pueden ser fuente de infecciones o enfermedades, cuyos efectos dependen de la

cantidad, tipo de excreta, de la alimentación del ganado (**Huerta Muñoz & Cruz Hernández, 2018**).

Los estiércoles animales pueden portar una considerable densidad de contaminantes biológicos, tales como bacterias patógenas resistentes y sus correspondientes genes de resistencia. Se ha comprobado por medio de varios análisis que el estiércol de las gallinas pueden portar grandes cantidades de bacterias resistentes a antibióticos (ARBs) y genes de resistencia a antibióticos (ARGs), en relación al estiércol de otros animales de uso ganadero (**Zhang et al., 2017**). En el centro del Ecuador, la actividad avícola representa una de las áreas económicas más importantes, aportando un porcentaje cercano al 60% de la producción de huevos del país (**Ricke & Gast, 2017**). En el sector avícola de esta región, han sido detectados con una elevada frecuencia la presencia de microorganismos patógenos con patrones de multiresistencia, demostrando que este sector puede representar un potencial reservorio de ARBs (**Sánchez-Salazar et al., 2019**). Los residuos de esta industria (gallinaza) son ampliamente utilizados por el sector agrícola. Motivo por el cual, es necesario evaluar si los métodos tradicionales de compostaje de gallinaza son apropiados para la reducción y eliminación de estos contaminantes biológicos, previa su utilización en suelos agrícolas.

1.1.2 Indicadores de contaminación fecal en abonos orgánicos

Para la evaluación de las densidades de bacterias y genes de resistencia, se aplicaron métodos fenotípicos y genotípicos. Se evaluaron por técnicas de microbiología convencional las densidades de *Escherichia coli*, coliformes totales, colifagos somáticos. Por medio de técnicas de biología molecular, se cuantificaron los niveles de ARGs.

1.1.2.1 *Escherichia coli*

E. coli es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota normal del intestino del ser

humano y los animales homeotermos, siendo la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales. Se excreta diariamente con las heces (entre 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).g⁻¹ de heces) y por sus características, es uno de los indicadores de contaminación fecal más utilizados últimamente **(Mercedes et al., 2013a)**.

Se ha demostrado que *E. coli* puede sobrevivir en el estiércol seco por más de sesenta días, bajo un gama de condiciones ambientales y se ha encontrado en los efluentes de avícolas cuyo proceso de descomposición en el abono resulta incompleto **(Sánchez, 2019)**.

1.1.2.2 Coliformes Totales

Entre los indicadores más usados se encuentran los coliformes, representados habitualmente por cuatro géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. Se trata de un grupo de bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, presentan actividad enzimática β -galactosidasa **(Vásquez et al., 2013)**.

De acuerdo a una investigación realizada por **Fuccz, Gómez, Cárdenas, & Campos. (2007)**, en la inactivación de los coliformes fecales se deben tener en cuenta factores ambientales como, la humedad, temperatura, luz ultravioleta, pH, ya que estos microorganismos al no encontrarse en un ambiente favorable y al no obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento se hacen más susceptibles a la inactivación

1.1.2.3 Colifagos Somáticos

Los colifagos son virus que infectan y se replican en *E. coli* del tracto gastrointestinal de organismos de sangre caliente; incluyen una gran variedad de fagos que pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae* **(Barquero et al., 2012)** Estos fagos han sido utilizados como indicadores de virus entéricos, ya que

comparten muchas características con estos virus, como lo es su composición, morfología y modo de replicación, lo cual los hace comportarse de manera similar en cuanto a su persistencia ambiental, su comportamiento ante las tensiones ambientales, variación estacional y grado de resistencia a la cloración (**Amarasiri et al., 2017**).

El análisis de colifagos somáticos se utiliza de forma habitual como indicador de contaminación fecal y marcador en el proceso de tratamiento de aguas (**Mercedes et al., 2013b**). Los colifagos son además, más resistentes a los procesos de tratamiento de agua, por lo cual (**Pullés & Pullés, 2014**) sugieren que su detección es de mayor utilidad que las bacterias fecales.

1.1.3 PCR en tiempo real para detección de ARGs

La PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), es una técnica moderna capaz de amplificar y cuantificar moléculas de ADN y ARN de una forma precisa. De igual manera ayuda a detectar más de un producto específico en una misma reacción. Los ensayos de la PCR en tiempo real son entre 10,000 y 100,000 veces más sensibles que las pruebas de protección por ARNasa, y pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (**Aguilera et al., 2012**).

Dentro de los sistemas de detección usados para qPCR, existen sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (**De Dios et al., 2013**). Existen dos tipos de sistemas de emisión de fluorescencia: TaqMan y SybrGreen. El método TaqMan se fundamenta en el uso de primers específicos y una sonda de hidrólisis que están diseñadas para incrementar la especificidad de la qPCR. Para la detección de ARGs, han sido diseñadas diferentes primers y sondas para determinar la presencia de genes que codifican resistencia a las principales familias de antibióticos, como betalactámicos, sulfonamidas, tetraciclinas, quinolonas, entre otras (**Berglund et al., 2014**). En la técnica Sybr Green, la magnitud de la fluorescencia aumenta proporcionalmente a la

concentración del ADN de doble cadena, ya que utiliza un colorante fluorescente que tiene afinidad por las moléculas de ADN (**Mathew, 2012**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos General

Evaluar la persistencia de los genes de resistencia a antibióticos e indicadores de contaminación fecal en muestras de estiércol durante procesos de compostaje tradicional de gallinaza.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la persistencia de los indicadores microbiológicos *Escherichia coli*, coliformes totales y colifagos somáticos, durante 49 días de compostaje.
- Evaluar la persistencia de cinco genes de resistencia a antibióticos (*sul1*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *ermB* y *tetW*), por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y del gen 16S rADN (*Universal*) en muestras del compostaje del estiércol de la gallina durante 49 días de compostaje.
- Analizar las cinéticas de inactivación de los indicadores microbiológicos y moleculares para cada tratamiento de compostaje (secado, cal, tamo y microorganismos).

1.3 Hipótesis

El compostaje tradicional de gallinaza puede reducir significativamente los niveles de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos.

CAPITULO II

METODOLOGIA

2.1. Materiales y Equipos

2.1.1 Equipos

Tabla 1. Equipos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Autoclave	1
Incubadora Bacteriológica	1
Balanza Analítica	1
Baño María	1
Mechero de Bunsen	1
Cámara de Flujo Laminar	1
Centrífuga Sorvall St8	1
Microcentrífuga Sorvall Legend Micro i7	1
Vórtex Digital	1
Termociclador Life Technologies Simple Amp	1
Transiluminador UV endurecido TM GDS Tower	1
Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000	1
Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System	1

2.1.2 Materiales

Tabla 2. Materiales de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Frasco tapa rosca azul en vidrio 500 mL	4
Frasco tapa rosca azul en vidrio 100 mL	2
Asa de inoculación	2
Cajas Petri de plástico	500
Tubos Eppendorf 1.5 mL	500
Tubos Falcon 50mL	100

Gradilla	3
Micropipetas 0,5 -10 μ L; 20 -200 μ L; 100-1000 μ l	1
Pipetas 10mL	5
Espátula	1
Puntas con filtro 10 μ l;100 μ l; 500 μ l ;1000 μ l	1000
Cajas Racks	5
Tubos de 0.2 mL para PCR	100
Tubos de ensayo con tapa 20mL	25
Placas MicroAmp de 96 pocillos	3 cajas
Aplicador de película adhesiva	1
Pinza metálica	1

2.1.3 Reactivos

Tabla 3. Reactivos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Caldo nutritivo LB (luria-Bertani)	1
Medio de Cultivo Cromocult	1
Medio de Cultivo Mac Conkey	1
Caldo de soja tríptico (TSB)	1
Solución Tampón buffer fosfato salino (PBS)	1
Alcohol industrial al 95%	1
Ultrapure TM 10X TBE buffer invitrogen	1 unidad
Agua Libre de Nucleasas (VWR)	10 unidades
DREAMTAQ Master Mix	3 unidades
Phusion U Green Multiplex PCR Master Mix F564L	1 unidad
Kit de extracción de ADN (EasyPrep TM Plasmid Midiprep-II Kit)	1 caja
Kit de purificación de productos de PCR (GenElute TM PCR Clean-Up Kit)	1caja
Primers gen (<i>16S rADN</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>qnrS</i> , <i>sull</i> , <i>emrB</i> , <i>tetW</i>)	1 unidad c/u

2.1.4 Insumos

Tabla 4. Insumos de Laboratorio

Detalle	Cantidad
Mascarillas	3 cajas
Guantes de Nitrilo	1 caja
Para film	1 caja
Papel aluminio	1 caja
Gel antibacterial	1 unidad
Jabón líquido	1 unidad
Cloro	1 litro

2.2. Métodos

2.2.1 Trabajo de Campo

2.2.1.1 Ubicación de la zona de ensayo

El muestreo del estiércol de gallina se realizó en la comunidad San José de Puñachizag, ubicada en el cantón Quero, provincia del Tungurahua, la cual se encuentra al sur del cantón, las coordenadas geográficas son: 1°24'14,5'' de latitud Sur y a 78°35'48,4'' de longitud Oeste y a 3118 msnm de altitud (sistema de posicionamiento global GPS).



Figura 1. Ubicación del lugar del Ensayo en el Cantón Quero

Fuente: Google Maps “Latitud: -1.351953, Longitud: -78.596163”

2.2.2 Preparación del compostaje de gallinaza

- 1) Se colocó aproximadamente 10 kilogramos de estiércol de gallina en bandejas de plástico previamente perforadas en la base inferior, el cual se evitó la acumulación de humedad en el tiempo de compostaje, y no afectar al producto. Cada experimento se ejecutó por triplicado.
- 2) Se adicionó los diferentes aditivos o productos químicos en cada bandeja como se muestra en la tabla 5, manteniendo una muestra control solo con gallina fresca para su comparación.

Tabla 5. Variedades de compostaje del estiércol de gallina.

Tratamientos	Estiércol de gallina (kg)	Nombre de Aditivo	Cantidades Aditivo (kg o mL)	Referencias
Bandeja 1	10	-----	-----	-----
Bandeja 2	10	Bacterias (ActiMax Compost ®)	30 mL	(Naranjo, 2013)
Bandeja 3	10	Cal agrícola (carbonato de calcio)	0,375 kg	(European Lean Association, 2009)
Bandeja 4	10	Cascarilla de arroz (tamo)	4 kg	(Roman et al., 2013)

- 3) Se colocó cada tratamiento en un lugar fresco y bajo sombra cubierto con plástico para evitar el aumento de temperatura.
- 4) Se procedió a realizar un volteo manual del compostado cada 4 días.

2.2.3 Recolección de las muestras

- 1) Se recolectó 200 g de muestra de cada tratamiento en frascos estériles de 500 mL, muy bien etiquetados para los respectivos análisis de laboratorio. Es primordial el volteo total de la mezcla, para dar una apropiada ventilación del compostaje.

- 2) Se midió la temperatura de cada tratamiento con la ayuda de un termómetro y mantener en un rango de 40 a 55°C.
- 3) Así mismo, se midió la humedad con la ayuda de un higrómetro en cada bandeja de muestra.
- 4) Se volteó la pila o mezcla para evitar que el compostaje este demasiado húmedo y no cambiar las condiciones iniciales.
- 5) Se realizó el mismo proceso en un periodo de 49 días, con intervalos establecidos entre cada muestreo, partimos en el primer día que se realizó la mezcla del estiércol con cada aditivo, siendo este el día 0 y paulatinamente se continuó con los días 1, 3, 6, 14, 21, 28, 35 y 49.

2.2.4 Trabajo de Laboratorio

2.2.4.1 Recuento de *Escherichia coli* y de bacterias coliformes

La metodología está basada en las metodologías de la US EPA Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (EPA/625/R-92/013 Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge Control of Pathogens and Vector Attraction, 2003) y en las adaptaciones realizadas para lodos de depuradora (**Calero-Cáceres et al., 2014**).

- 1) Se colocó 4,5 mL de solución tampón Buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de phosphate buffered saline) en los respectivos tubos de ensayo con tapa ya rotulados.
- 2) Se agregó 0,5 g de muestra de gallinaza de cada tratamiento para formar la primera dilución (10^{-1}), y centrifugar por 5 minutos a (3.000xg) para descartar los sólidos suspendidos.
- 3) Se preparó diluciones seriadas de las muestras usando solución PBS en tubos eppendorf de 1 mL hasta alcanzar a la dilución 10^{-5} .
- 4) Se colocó 100 µl sobre la placa con medio de cultivo Chromocult y realizar la siembra por difusión en placa.
- 5) Se incubó aerobiamente las placas inoculadas en posición invertida a 35-37 °C.

- 6) Después de la incubación (aproximadamente 18 a 24 horas), se realizó el conteo de las placas para comprobar la presencia de las colonias que usualmente son violetas para *E. coli* y rojas de bacterias coliformes.
- 7) Se calculó las unidades formadoras de colonia.

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la muestras sembrada}}$$

2.2.4.2 Recuento de bacteriófagos

La metodología está basada en la norma ISO 10705-2:2000, para el recuento de colifagos somáticos.

- 1) Se colocó 4,5 mL de solución tampón PBS en los respectivos tubos de ensayo con tapa ya rotulados.
- 2) Se agregó 0,5 g de muestra de gallinaza de cada tratamiento para formar la primera dilución (10^{-1}), y centrifugar por 5 minutos a (3.000xg) para descartar los sólidos suspendidos.
- 3) Se absorbió el sobrenadante con una jeringuilla sin punta y filtrar a través de un micro filtro de baja adsorción proteica con un diámetro 0.22 μm en un tubo eppendorf.
- 4) Se preparó diluciones seriadas de las muestras usando solución PBS en tubos eppendorf de 1 mL hasta alcanzar a la dilución 10^{-5} .
- 5) Se inoculo la cepa *E. coli* WG5 en medio nutritivo de caldo de soja triptona (conocido también por sus siglas en inglés, TSB, de Tryptic Soy Broth) de 2 a 3 horas para su activación.
- 6) Se fundió el medio MSA semisólido y se agregó cloruro de calcio al 5%, luego se agregó 2.5 mL en tubos de ensayo con tapa, previamente esterilizados, y colocarlos en el termostato a 45 °C.
- 7) Para comenzar con la inoculación se seleccionó un tubo del termostato y se agregó 1000 μL de la muestra filtrada con 1000 μl de la bacteria *E. coli* WG5.

- 8) Simultáneamente, se agitó el tubo evitando la formación de burbujas y se vertió en una placa con medio MSA sólido, dispersando por toda la placa hasta que la mezcla se enfrió y se fijó por completo.
- 9) Se rotuló la caja con el nombre de la muestra, la dilución y la fecha, se lleva a la incubadora a 37 °C por 24 horas.
- 10) Se realizó el conteo de las placas para comprobar la presencia de colifagos somáticos.
- 11) Se calculó las unidades formadoras de colonia.

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Factor de dilución}}{\text{volumen de la muestras sembrada}}$$

2.2.4.3 Protocolo de aislamiento de ADN de heces para la detección de patógenos (Quiagen, 2014).

- 1) Se pesó 180–220 mg de heces en un tubo de microcentrífuga de 2 mL (no incluido) y coloque el tubo en hielo.
- 2) Se agregó 1000 µl de tampón InhibitEX a cada muestra de heces. Se agita en vórtex continuamente durante 1 minuto o hasta que la muestra de heces esté completamente homogeneizada, es importante agitar las muestras a fondo. Esto ayuda a asegurar la concentración máxima de ADN al final.
- 3) Se calentó la suspensión durante 5 minutos a 70 ° C, luego a vórtex durante 15 segundos, este paso de calentamiento ayudó a lisar las bacterias.
- 4) Se centrifugó la muestra a toda velocidad (20.000xg) durante 1 minuto para sedimentar las partículas de heces. No se transfiere ningún material sólido, y si las partículas aún son visibles en el sobrenadante, se debe centrifugar la muestra nuevamente.
- 5) Se pipeteó 15 µl de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (no incluido).
- 6) Se pipeteó 200 µl de sobrenadante del paso 4 en el tubo de microcentrífuga de 1,5 mL que contiene proteinasa K,
- 7) Se añadió 200 µl de tampón AL y agitar en vórtex durante 15 segundos.
- 8) Se incubó a 70 ° C durante 10 min

- 9) Se agregó 200 µl de etanol (96–100%) al lisado y se hizo un mezclado en el vórtex durante 15 segundos
- 10) Se agregó cuidadosamente 600 µl de lisado del paso 9 a la columna de centrifugación QIAamp y se centrifugó a (20.000xg) durante 1 minuto.
- 11) Se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y deseche el tubo que contiene el filtrado, en ocasiones el lisado no pasa por completo a través de la columna después de la centrifugación, por lo que se volvió a centrifugar nuevamente hasta que la columna de centrifugación QIAamp esté vacía.
- 12) Se abrió con cuidado la columna de centrifugación QIAamp para evitar contaminación, se agregó 500 µl de Buffer AW1 y se llevó a la centrifuga a 20000xg durante 1 min.
- 13) Se colocó la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de recolección de 2 mL y se realizó el desecho del tubo de recolección que contuvo el filtrado.
- 14) Se abrió con cuidado nuevamente la columna de centrifugación QIAamp y se agregó 500 µl de Buffer AW2.
- 15) Se llevó a centrifuga a (20.000xg) durante 3 min, se desechó el filtrado que contiene el tubo de recolección y se llevó nuevamente la centrifuga a (20.000xg) durante el mismo tiempo, este paso ayudó a eliminar la posibilidad de una posible transferencia de Buffer AW2, y desechar el tubo de recolección
- 16) Se transfirió la columna de centrifugación QIAamp a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL etiquetado (no incluido) y pipetear 200 µl de tampón ATE directamente sobre la membrana QIAamp.
- 17) Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, luego centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto para eluir el ADN.
- 18) Para el almacenamiento a largo plazo, recomendamos mantener el ADN en congelación a -20°C.

2.2.4.4 Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica TaqMan para los genes *sul1*, *blaTEM*, *tet(W)*, *qnrS* y *16S rADN* (Valle & Calero, 2019)

- 1) Para la preparación de la reacción de PCR cuantitativa (qPCR), se realizó a partir del protocolo de qPCR detallado en la tabla 2.

Tabla 6. Protocolo de qPCR con sondas TaqMan

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

- 2) Se calculó el volumen a inocular del reactivo TaqMan MASTER MIX y primer + Sonda para el número de muestras de ADN bacteriano, los estándares y los blancos de muestra, se mezcló en un tubo microcentrífuga.
- 3) Se transfirió 11 µl de la mezcla realizada en el paso 2, en cada espacio de muestra de una placa óptica.
- 4) Se agregó 9 µl de los estándares de verificación según el gen de resistencia utilizando las diluciones (-1, -2 -3) en los espacios correspondientes (véase figura 2)
- 5) Agregar un volumen de 9 µl de cada muestra de ADN bacteriano, el orden y la cantidad dependerá del número de muestras a analizar cómo se puede apreciar en la figura 2.

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

B

Blanco (Master mix, primer y Sonda)

E

Estándares (Estándar, Master mix, primer y Sonda)

M

Muestra (ADN bacteriano, Master mix, primer y Sonda)

Figura 2. Placa de qPCR Thermo Fisher Scientific.

- 6) Se colocó la placa en el termociclador y analizar la gráfica de amplificación.

2.2.4.5 Metodología para PCR cuantitativa (qPCR) mediante la Técnica SYBR-Green para el gen ermB (Valle & Calero, 2019)

- 1) Para la preparación de qPCR SYBR Green se realizará a partir del protocolo detallado en la tabla 3

Tabla 7. Protocolo qPCR SYBR Green

Reactivo	Cantidad (μL)	Descripción
Master Mix	5	PowerUp TM SYBR TM Green Master Mix
Primer 1	0.25	Concentración: 10 pmol
Primer 1	0.25	Concentración: 10 pmol
Muestra	4.5	ADN bacteriano

- 2) Se calculó el volumen a inocular del reactivo SYBR Green, primer Forward, primer reverse, para el número de muestras de ADN bacteriano, los estándares y los blancos de muestra, se mezcló en un tubo microcentrífuga.
- 3) Se transfirió 5,5 μ l de la mezcla realizada en el paso 2, en cada espacio de muestra de una placa óptica.
- 4) Se agregó 4,5 μ l de los estándares de verificación según el gen de resistencia utilizando las diluciones (-1, -2 -3) en los espacios correspondientes (véase figura 2)
- 5) Se agregó un volumen de 4,5 μ l de cada muestra de ADN bacteriano, el orden y la cantidad dependerá del número de muestras a analizar cómo se puede apreciar en la figura 2
- 6) Se selló la placa con una cubierta de adhesivo óptico y centrifugar brevemente.
- 7) Se colocó la placa en el termociclador y analizar la gráfica de amplificación.

2.2.4.6 Condiciones de reacción qPCR

La reacción de qPCR se realizó en un Termociclador 7500 Fast Real- Time PCR System de Applied Biosystems usando el programa con el siguiente régimen del ciclado: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 15 s a 95°C, 1 min a 60°C.

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

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

PCR	CICLOS	REACCIÓN
Real- Time qPCR	25	

Para la reacción de qPCR *emrB* se realizó con el siguiente orden del ciclado: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, 15 s a 95°C, 20 s a 58°C, como se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de reacción de Real- Time qPCR (Sybr)

PCR	CICLOS	REACCIÓN
Real- Time qPCR	25	

Los primers utilizados para la amplificación de genes de resistencia por qPCR se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Primers utilizados en el estudio para la amplificación de genes de resistencia por PCR cuantitativa (qPCR)

GEN	PRIMER	SECUENCIA (5'- 3')	REFERENCIA
<i>bla</i> _{TEM}	UP	CACTATTCTCAGAATGACTTGGT	(Lachmayr et al., 2009)
	LP	ATCCGCCTCCATCCAGTCTA	
	Sonda	6FAM-CCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGG-MGBNFQ	
<i>sul1</i>	UP	CCGTTGGCCTTCCTGTAAAG	(Modificado de Czekalski, Berthold, Cauci, Egli, & Burgmann, 2012)
	LP	TTGCCGATCGCGTGAAGT	
	Sonda	FAM-CGAGCCTTGCGGCGG-MGBNFQ	
<i>tetw</i>	UP	CGGCAGCGCAAAGAGAAC	(Walsh et al., 2011)
	LP	CGGGTCAGTATCCGCAAGTT	
	Sonda	VIC-CTGGACGCTCTTAGG-MGBNFQ	
<i>qnrS</i>	UP	CGACGTGCTAACTTGCGTGA	(Colomer-Lluch et al., 2011)
	LP	GGCATTGTTGGAAACTTGCA	
	Sonda	GGCATTGTTGGAAACTTGCA	
16S rADN	UP	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	(Nadkarni et al., 2002)
	LP	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	
	Sonda	6FAM-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-MGBNFQ	
ermB	UP	GATACCGTTTACGAAATTGG	(Chen et al., 2007)
	LP	GATACCGTTTACGAAATTGG	

2.2.4.7 Cinética de Inactivación de Indicadores Microbiológicos y Moleculares, Valor D

Para el análisis de la inactivación de los dos tipos de indicadores tanto microbiológicos (*E. coli*, coliformes totales y colifagos somáticos) como los moleculares (*sulI*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, y *tetW*, 16S rADN), se utilizó el Valor D que es el tiempo de reducción decimal (D) es el que se requiere para reducir 10 veces la densidad de población a una determinada condición.

$$D_t = \frac{x}{\log(N_0/N_1)}$$

Donde:

D_t : tiempo de reducción decimal a una determinada condición.

x : tiempo en días a una determinada condición.

N_0 : número de células al inicio de un tratamiento

N_1 : número de células después de un tratamiento

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

En la presente investigación, se realizó un estudio de la persistencia de estos indicadores durante el proceso de compostaje tradicional de la gallinaza, aplicando diferentes tratamientos: secado por volteo (fresca sin aditivo), adición de cal, adición de microorganismos y adición de tamo (cascarilla de arroz), con la finalidad de disminuir significativamente estos contaminantes biológicos.

En primer lugar, se presenta un resumen general de las densidades de microorganismos y de la abundancia de ARGs por los cuatro tratamientos, como la media de las mediciones y la desviación estándar (en paréntesis). Los resultados están expresados por gramos de peso seco. En la misma tabla, se integran los resultados estadísticos aplicados en función de la inactivación (N – No) de tales indicadores después de 49 días. Los análisis estadísticos aplicados fueron un Análisis de Varianza Completamente Aleatorio, Prueba de Medias y Estadística Descriptiva. Posteriormente, se detallan gráficas que describen de manera individual el comportamiento de cada uno de los indicadores analizados, siendo complementados con la información estadística correspondiente.

Las densidades de microorganismos se encuentran por encima de 5 log UFC/g en el caso de los indicadores bacterianos, y de 5 log UPF/g en el caso de los colifagos somáticos. Se observa una completa reducción de los indicadores bacterianos después de 49 días. Sin embargo, en el caso de los colifagos somáticos, se observa sólo una completa eliminación en los tratamientos con bacterias y fresca. De acuerdo al ANOVA completamente aleatorio, todas las reducciones son altamente significativas $P < 0,01$ (99%) **. De acuerdo a la Prueba de Medias de Tukey, el tratamiento con bacterias reduce de forma más eficiente las densidades de estos indicadores microbiológicos, ya que se ubica en la categoría más alta en todos los casos (A).

Tabla 11. Resumen de los indicadores microbiológicos y moleculares para cada tratamiento evaluado.

Días	<i>E. coli</i> (log UFC/g)**						Coliformes (log UFC/g)**									
	Fresca ^B		Cal ^{AB}		Tamo ^{AB}		Bacteria ^A		Fresca ^C		Cal ^B		Tamo ^C		Bacteria ^A	
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
0	5.06	(0.05)	5.15	(0.06)	5.14	(0.09)	5.29	(0.02)	5.03	(0.04)	5.49	(0.16)	5.03	(0.03)	5.92	(0.11)
1	5.00	(0.17)	5.10	(0.01)	5.07	(0.02)	5.15	(0.05)	4.95	(0.03)	5.26	(0.01)	4.92	(0.04)	5.06	(0.04)
3	4.80	(0.13)	5.07	(0.02)	4.69	(0.07)	4.67	(0.04)	4.87	(0.07)	5.12	(0.02)	4.87	(0.03)	4.84	(0.03)
6	4.44	(0.05)	4.59	(0.04)	3.46	(0.03)	4.52	(0.07)	4.77	(0.05)	4.90	(0.07)	4.75	(0.06)	3.76	(0.05)
14	3.42	(0.08)	3.71	(0.04)	3.40	(0.05)	3.33	(0.06)	3.72	(0.03)	4.70	(0.05)	3.91	(0.02)	3.60	(0.04)
21	0.00	(0.03)	2.59	(0.03)	2.64	(0.03)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	3.89	(0.03)	2.65	(0.09)	0.00	(0.00)
28	0.00	(0.15)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	2.86	(0.02)	2.30	(0.04)	0.00	(0.00)
35	0.00	(0.08)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)
49	0.00	(0.03)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)	0.00	(0.00)
Días	Bacteriófagos (log UPF/g)**						blaTEM (log CG/g)**									
	Fresca ^A		Cal ^C		Tamo ^C		Bacteria ^A		Fresca ^B		Cal ^B		Tamo ^B		Bacteria ^A	
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
0	5.14	(0.06)	5.08	(0.02)	5.06	(0.03)	5.05	(0.02)	6.83	(0.05)	6.94	(0.05)	6.96	(0.14)	7.33	(0.02)
1	4.94	(0.05)	4.95	(0.00)	4.85	(0.04)	4.82	(0.02)	6.68	(0.17)	6.95	(0.04)	6.65	(0.03)	6.90	(0.03)
3	3.95	(0.03)	4.86	(0.05)	3.94	(0.03)	4.61	(0.02)	6.62	(0.13)	6.36	(0.06)	6.47	(0.08)	6.52	(0.10)
6	3.59	(0.03)	3.95	(0.04)	3.78	(0.05)	3.47	(0.10)	6.42	(0.05)	6.30	(0.05)	6.21	(0.06)	6.43	(0.03)
14	3.41	(0.04)	3.62	(0.04)	3.58	(0.07)	3.29	(0.03)	6.09	(0.08)	6.06	(0.04)	6.10	(0.03)	6.03	(0.03)
21	2.24	(0.09)	2.68	(0.04)	2.57	(0.05)	2.69	(0.05)	5.86	(0.03)	5.92	(0.06)	5.97	(0.06)	6.31	(0.10)
28	2.02	(0.06)	2.48	(0.02)	2.50	(0.05)	2.33	(0.07)	5.41	(0.15)	5.79	(0.05)	5.78	(0.05)	5.88	(0.00)
35	0.00	(0.00)	2.25	(0.07)	2.40	(0.03)	2.00	(0.04)	5.32	(0.08)	5.35	(0.05)	5.41	(0.05)	5.33	(0.08)
49	0.00	(0.00)	2.20	(0.05)	1.90	(0.05)	0.00	(0.00)	5.16	(0.03)	5.32	(0.11)	5.19	(0.01)	4.17	(0.10)
Días	sul1 (log CG/g)**						qnrS (log CG/g)**									
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD

Días	Fresca ^C		Cal ^{BC}		Tamo ^{AB}		Bacteria ^A		Fresca ^B		Cal ^B		Tamo ^A		Bacteria ^A	
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
0	8.25	(0.01)	9.11	(0.17)	8.93	(0.15)	9.15	(0.22)	4.23	(0.08)	4.07	(0.06)	4.53	(0.07)	4.95	(0.09)
1	8.22	(0.06)	9.13	(0.09)	8.57	(0.21)	8.81	(0.12)	3.55	(0.04)	3.83	(0.03)	4.30	(0.06)	4.37	(0.12)
3	8.18	(0.06)	9.00	(0.02)	8.65	(0.06)	8.73	(0.08)	3.46	(0.13)	3.38	(0.16)	3.82	(0.10)	3.56	(0.19)
6	8.38	(0.05)	8.90	(0.02)	8.86	(0.06)	8.83	(0.02)	3.30	(0.03)	3.28	(0.00)	3.37	(0.07)	3.72	(0.37)
14	8.85	(0.02)	8.84	(0.01)	8.72	(0.02)	8.81	(0.03)	3.22	(0.02)	3.26	(0.06)	3.06	(0.23)	3.57	(0.27)
21	8.77	(0.21)	8.94	(0.21)	8.59	(0.01)	8.83	(0.01)	3.06	(0.06)	3.18	(0.03)	2.98	(0.22)	3.45	(0.13)
28	8.66	(0.04)	8.78	(0.18)	8.45	(0.05)	8.68	(0.02)	2.90	(0.06)	3.05	(0.17)	2.54	(0.12)	3.09	(0.37)
35	8.50	(0.04)	8.45	(0.02)	8.28	(0.02)	8.19	(0.04)	2.76	(0.09)	3.10	(0.22)	2.31	(0.01)	2.62	(0.07)
49	8.35	(0.02)	8.66	(0.03)	8.10	(0.00)	7.95	(0.09)	2.88	(0.07)	2.92	(0.26)	2.60	(0.12)	2.74	(0.01)

Días	tetW (log CG/g)**				16S rDNA (log CG/g)**											
	Fresca ^C		Cal ^B		Tamo ^B		Bacteria ^A		Fresca ^B		Cal ^{AB}		Tamo ^{AB}		Bacteria ^A	
x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	
0	9.14	(0.01)	9.74	(0.06)	9.71	(0.10)	10.01	(0.01)	7.17	(0.01)	6.17	(0.10)	7.38	(0.26)	8.29	(0.40)
1	9.19	(0.11)	9.20	(0.40)	9.30	(0.14)	9.56	(0.07)	6.92	(0.11)	5.84	(0.11)	6.80	(0.17)	8.07	(0.06)
3	9.14	(0.04)	8.86	(0.05)	9.06	(0.01)	9.29	(0.18)	6.57	(0.10)	5.56	(0.15)	6.45	(0.01)	7.97	(0.14)
6	9.01	(0.15)	8.82	(0.06)	8.97	(0.01)	9.27	(0.01)	6.80	(0.04)	5.54	0.00	6.07	(0.17)	7.40	(0.23)
14	8.72	(0.09)	8.75	(0.05)	8.85	(0.08)	9.10	(0.10)	6.67	(0.12)	5.09	(0.13)	6.03	(0.23)	7.56	(0.13)
21	8.63	(0.02)	8.61	(0.00)	8.71	(0.11)	9.08	(0.12)	5.52	(0.23)	4.95	(0.10)	6.04	(0.10)	6.85	(0.35)
28	8.59	(0.06)	8.44	(0.02)	8.59	(0.16)	8.97	(0.13)	4.30	(0.14)	4.72	(0.02)	5.79	(0.02)	6.37	(0.21)
35	8.41	(0.03)	8.25	(0.06)	8.43	(0.08)	8.40	(0.22)	4.24	(0.02)	4.28	(0.18)	5.24	(0.09)	6.32	(0.08)
49	8.37	(0.01)	8.20	(0.04)	8.15	(0.01)	7.75	(0.19)	3.31	(0.12)	3.79	(0.48)	4.94	(0.11)	6.27	(0.34)

P < 0,01 (99%) ** Altamente significativo. **A, B, C:** categorías de la Prueba de Medias de Tukey.

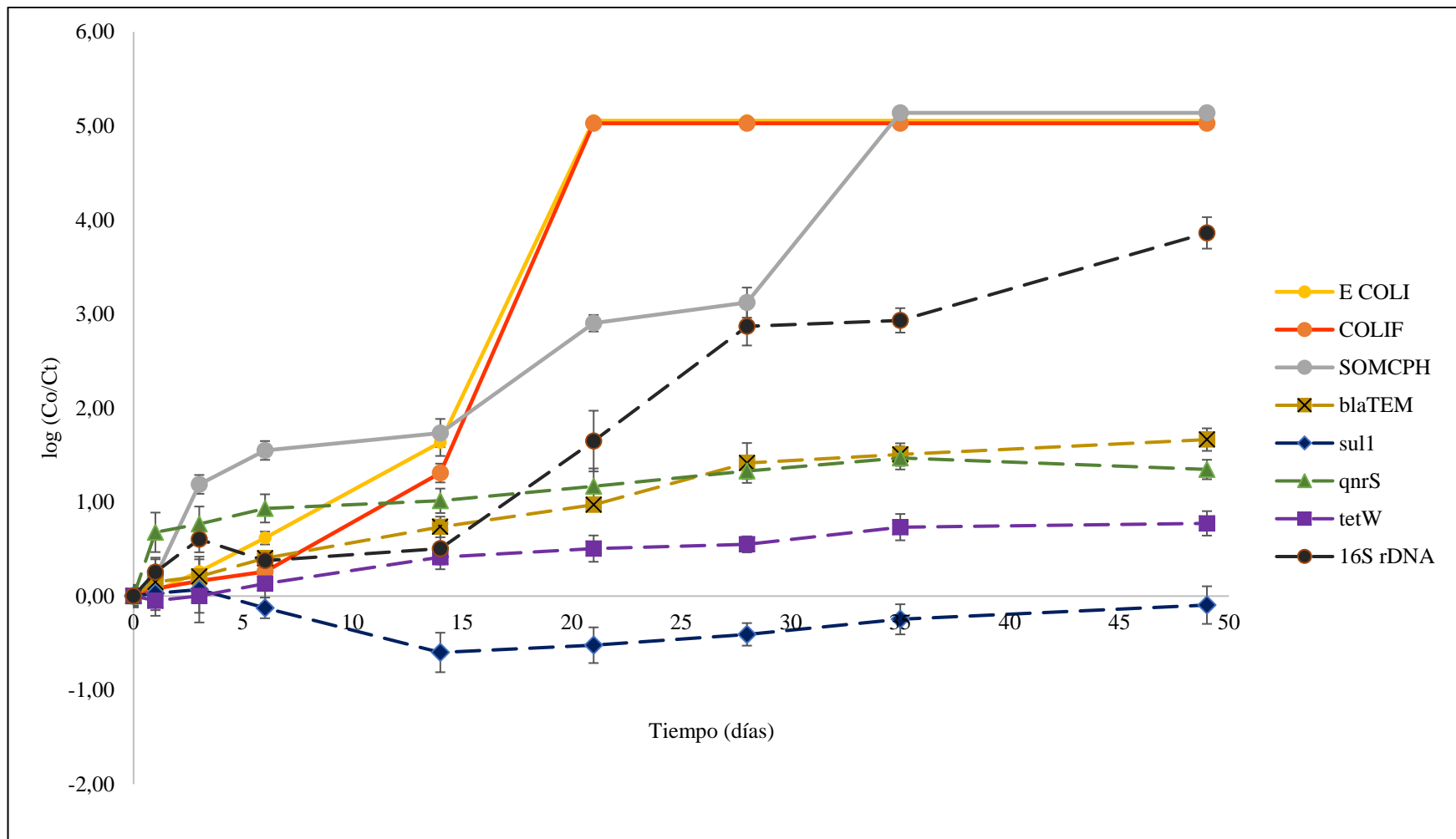


Figura 3. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento fresca (T1).

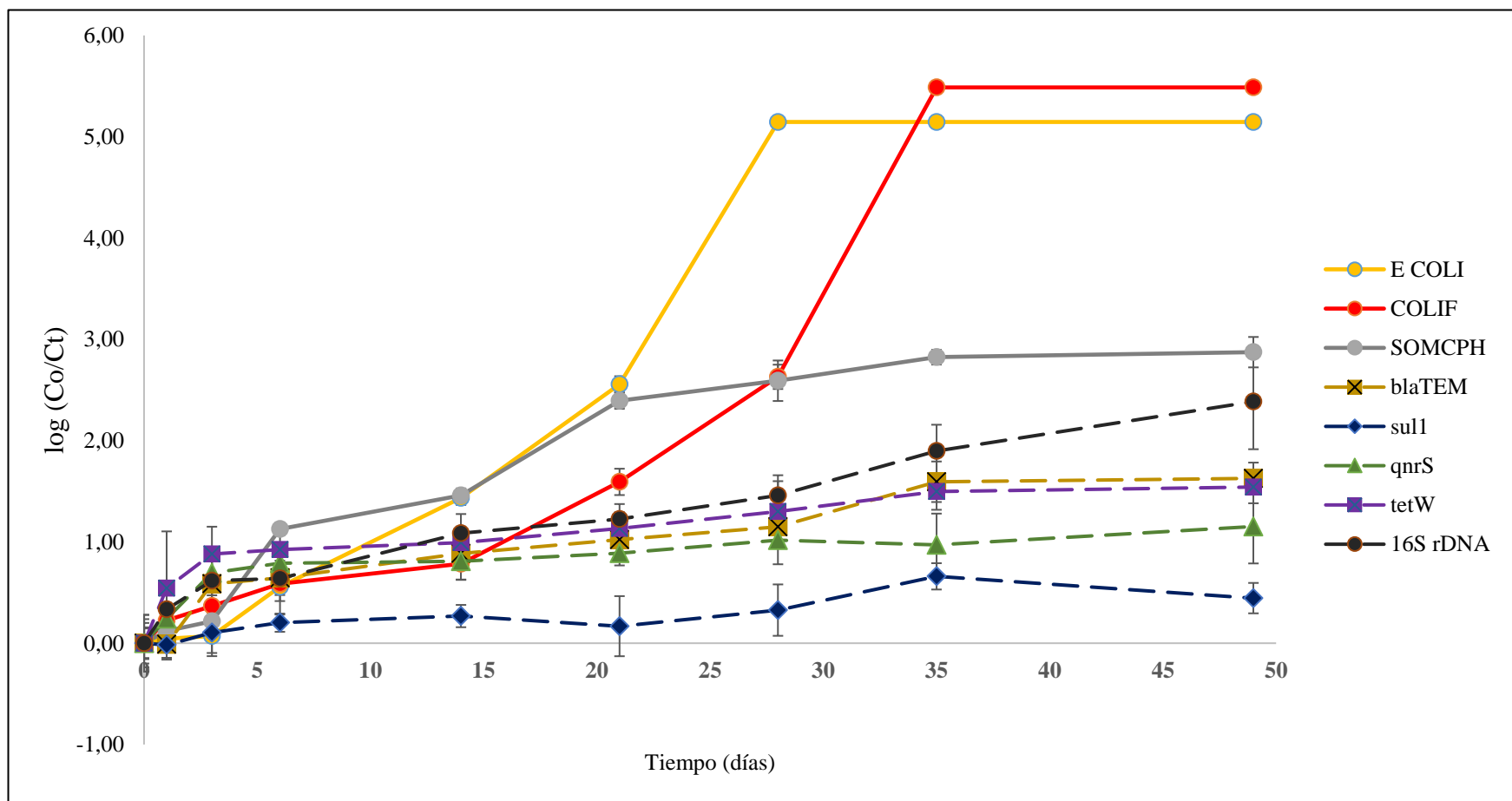


Figura 4. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con cal (T2) durante 49 días de compostaje.

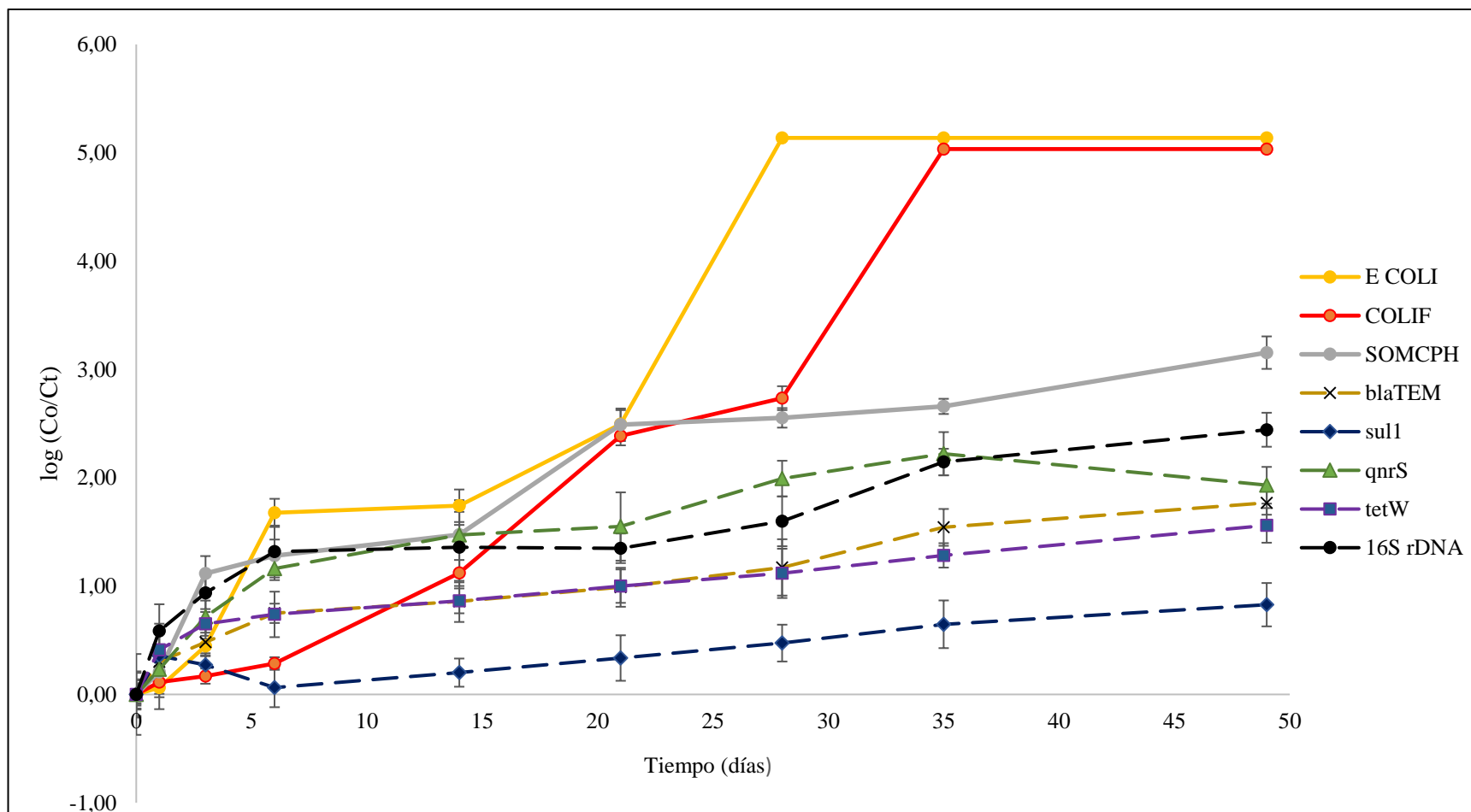


Figura 5. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con tamo (T3) durante 49 días de compostaje.

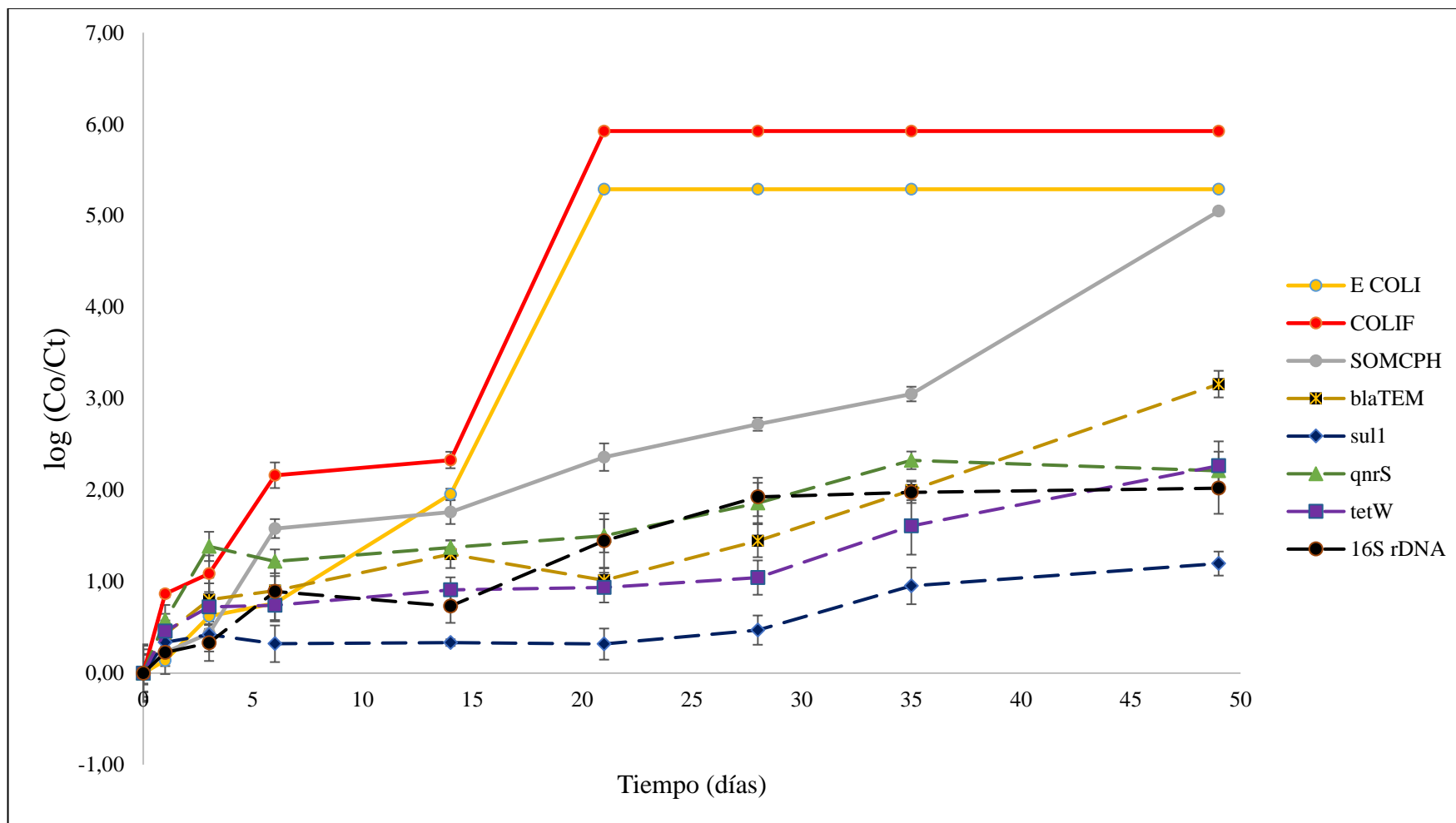


Figura 6. Persistencia de los ARGs y del gen 16S rDNA durante 49 días durante el tratamiento con bacterias (T4) durante 49 días de compostaje.

En el caso de los ARGs, se encuentran presentes en elevadas densidades, las cuales se encuentran en un intervalo de 4 log CG/mL en el caso del gen de resistencia a quinolonas *qnrS*, hasta abundancias cercanas a los 10 log CG/mL en el caso del gen *tetW*. La concentración de estos genes en la matriz de gallinaza es comparable a la observable en lodos de depuradora de aguas residuales y de sedimentos de río con alta actividad antropogénica (Calero-Cáceres et al., 2014, 2017). De acuerdo al Análisis de Varianza, todas las reducciones fueron altamente significativas después de 49 días ($P < 0,01$). Sin embargo, las densidades finales (49 días) son todavía muy elevadas, comparables a las alcanzadas en procesos de desinfección e inactivación natural de aguas residuales (Calero-Cáceres & Muniesa, 2016).

Los cuatro tratamientos que se emplearon para el compostaje de la gallinaza ayudaron a disminuir significativamente los contaminantes biológicos (*E. coli*, coliformes totales y colifagos somáticos). No obstante, en los tratamientos T2 (cal) y T3 (tamo) se observó una mayor persistencia de bacterias. Los resultados de los análisis mostraron la ausencia de *E. coli* y coliformes totales en los cuatro tratamientos después de 15 días de compostaje de la gallinaza, donde se verificó la disminución de la carga microbiana inicial, gracias al proceso de compostaje.

Según la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), los límites máximos permitidos de coliformes fecales en productos orgánicos de origen animal para el uso de biofertilizantes empleados en cultivos deben ser menores a 1 NMP/g MS o menos de 1000 coliformes por gramo de peso seco; de modo que, la cantidad de coliformes totales detectados en la gallinaza se encontraron dentro del rango establecido, puesto que solo se detectaron coliformes hasta el día 14. Según Tuse et al., (2018) es importante tratar previamente el estiércol de animal antes de ser utilizados como abonos, con el fin de reducir la cantidad de coliformes y evitar así la contaminación biológica de los cultivos, suelos y el ambiente animal.

Según varios estudios, se han demostrado el transporte vertical y superficial de coliformes en el suelo después de ser tratados con estiércoles de animales, representando un potencial riesgo de integración dentro de la cadena alimentaria. La presencia de determinados patotipos de coliformes puede representar un riesgo el cual puede provocar una diversa variedad de problemas gastrointestinales en los consumidores **(Cabral et al., 2010)**.

El proceso de reducción del gen 16S rDNA fue análogo al de las poblaciones microbianas, denotándose que se pudieron presentar de forma simultánea eventos de muerte celular, lisis y degradación del ADN bacteriano. La reducción ocurrió entre 2 a 4 log CG/g para todos los tratamientos. Entre los ARGs, el gen que mostró una mayor degradación fue *bla*_{TEM}, en donde la reducción de las densidades alcanzó valores promedios desde 0.74 hasta 1.66 log₁₀/g. El gen *qnrS* presentó una degradación también considerable, a diferencia del anterior gen; este gen mostró una alta reducción desde los primeros días con valores promedios que fueron desde 0.68 hasta 1.01 log₁₀/g y al llegar a las últimas semanas hubo un pequeño incremento en su reducción comprendiendo valores promedios entre 1.17 hasta 1.35 log₁₀/g. Sin embargo, al terminar el proceso de compostaje, las densidades de estos ARGs continuaban siendo elevadas, tan comparables a las de otros estiércoles de origen animal **(Ben et al., 2017; McEachran et al., 2015; Zhu et al., 2013)**.

En cuanto a los genes con mayor persistencia, fueron *tetW* y *sull*; estos genes presentaron una reducción en sus densidades entre 0 y 2 log CG/g a lo largo de los 49 días evaluados. En investigaciones relacionadas, estos ARGs están presentes en elevadas densidades en enclaves contaminados por residuos de origen urbano y animal **(Proia et al., 2018; Rodriguez-Mozaz et al., 2015; Xu et al., 2015; Zhao et al., 2017)**.

Análisis de las cinéticas de inactivación de los indicadores microbiológicos y moleculares para cada tratamiento de compostaje (tamo, cal, secado y microorganismos).

La figura 7 representa la inactivación de los indicadores microbiológicos y de los ARGs, en el tratamiento de la gallinaza fresca sin aditivo (T1) durante 49 días de compostaje. Se observó que las bacterias *E.coli* y coliformes tuvieron su inactivación al llegar al día 14, mientras que los bacteriófagos alcanzaron una resistencia mayor de inactivación hasta el día 28.

En el caso de los ARGs, el gen que alcanzó una menor inactivación fue *tetW* con un valor de -1,02 log (N/N0) al día 49. Seguidamente de los genes *sul1* y *qnrS* que alcanzaron valores similares aproximadamente -1,35 log (N/N0) al día 49, en el caso del gen *sul1* se presentó una menor inactivación durante los primeros días a diferencia del gen *qnrS* que se observó una mayor inactivación. En cambio los genes *bla*_{TEM} y 16S rDNA mostraron una alta inactivación, el gen *bla*_{TEM} tuvo un valor de -1,67 log (N/N0), mientras que el 16S rDNA un valor de -1,99 log (N/N0) al llegar al día 49; siendo el gen 16S rDNA con mayor resistencia de inactivación.

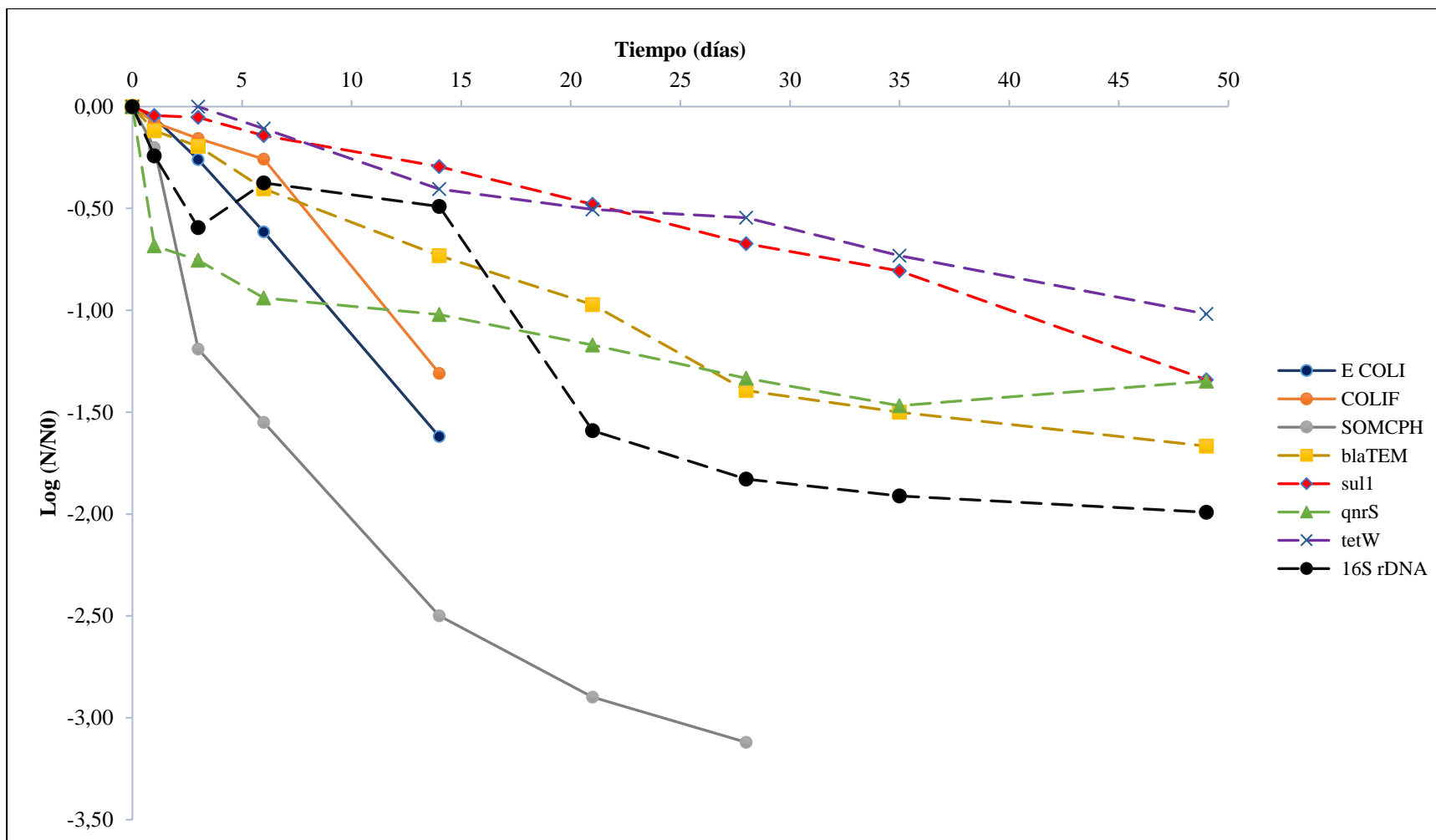


Figura 7. Inactivación térmica de la gallinaza fresca sin aditivo (T1) durante 49 días de compostaje.

La figura 8 representa la inactivación de los indicadores microbiológicos y de los ARGs, en el tratamiento de la gallinaza con cal (T2) durante 49 días de compostaje. Se observó que las bacterias *E.coli* y coliformes tienen una mayor inactivación, puesto que *E.coli* pierde su actividad total al día 21 con un valor de -2,56 log (N/N0) y los coliformes pierden su actividad total al día 28 con un valor de -2,65 log (N/N0), mientras que los bacteriófagos mostraron una menor inactivación que las otras dos bacterias, pues alcanzó un valor de -2,87 log (N/N0) al día 49.

En el caso de los ARGs, el gen que alcanzó una menor inactivación fue *sul1* con un valor de -1,02 log (N/N0) al día 49, seguidamente del gen *qnrS* con un valor de -1,24 log (N/N0) al día 49. Los genes *tetW* y *bla_{TEM}* alcanzaron valores similares aproximadamente -1,54 log (N/N0) y -1,69 log (N/N0). En cambio el gen 16S rDNA alcanzó una mayor inactivación que fue de -2,18 log (N/N0) al llegar al día 49.

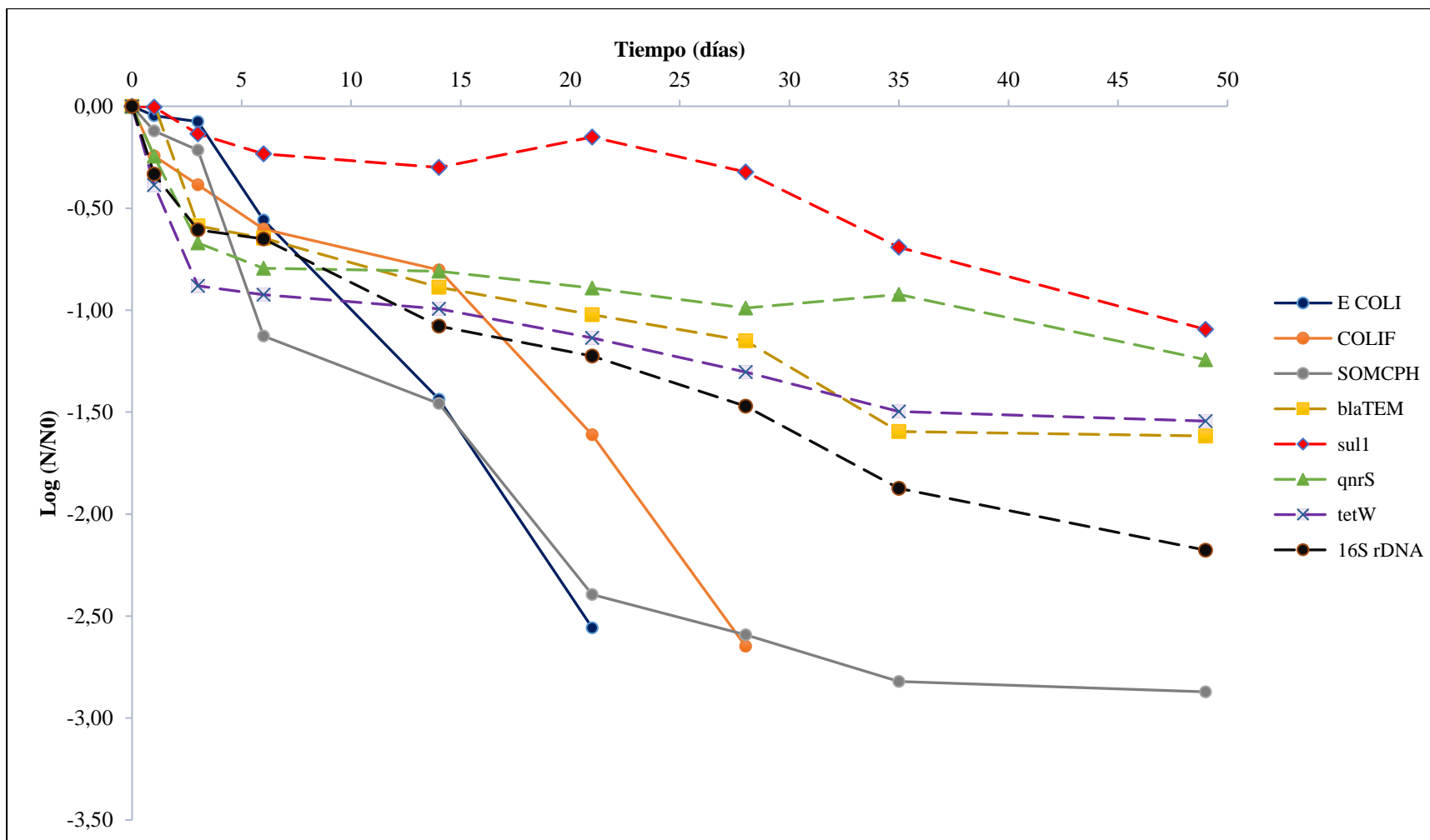


Figura 8. Inactivación térmica de la gallinaza con cal (T2) durante 49 días de compostaje.

La figura 9 representa la inactivación de los indicadores microbiológicos y de los ARGs, en el tratamiento de la gallinaza con tamo (T3) durante 49 días de compostaje. Se observó que las bacterias *E.coli* y coliformes tienen una mayor inactivación, puesto que *E.coli* pierde su inactividad total al día 21 con un valor de -2,53 log (N/N0) y los coliformes pierden su inactividad total al día 28 con un valor de -2,73 log (N/N0). Por otro lado los bacteriófagos mostraron una menor inactivación, pues alcanzó un valor de -3,31 log (N/N0) al día 49.

En el caso de los ARGs, el gen que alcanzó una menor inactivación fue *sul1* con un valor de -1,02 log (N/N0) al día 49. Seguidamente de los genes *bla_{TEM}* y *tetW* que alcanzaron valores similares aproximadamente -1,61 log (N/N0) al día 49, el gen *bla_{TEM}* presentó una menor inactivación al día 35 que fue de -1,56 log (N/N0), mientras que el gen *tetW* mostró una mayor inactivación al día 35 que fue de -1,29. En cambio los genes 16S rDNA y *qnrS* mostraron una mayor inactivación, el gen 16S rDNA tuvo un valor de -1,87 log (N/N0), mientras que el *qnrS* fue de -1,99 log (N/N0) al llegar al día 49, siendo el gen con mayor inactivación.

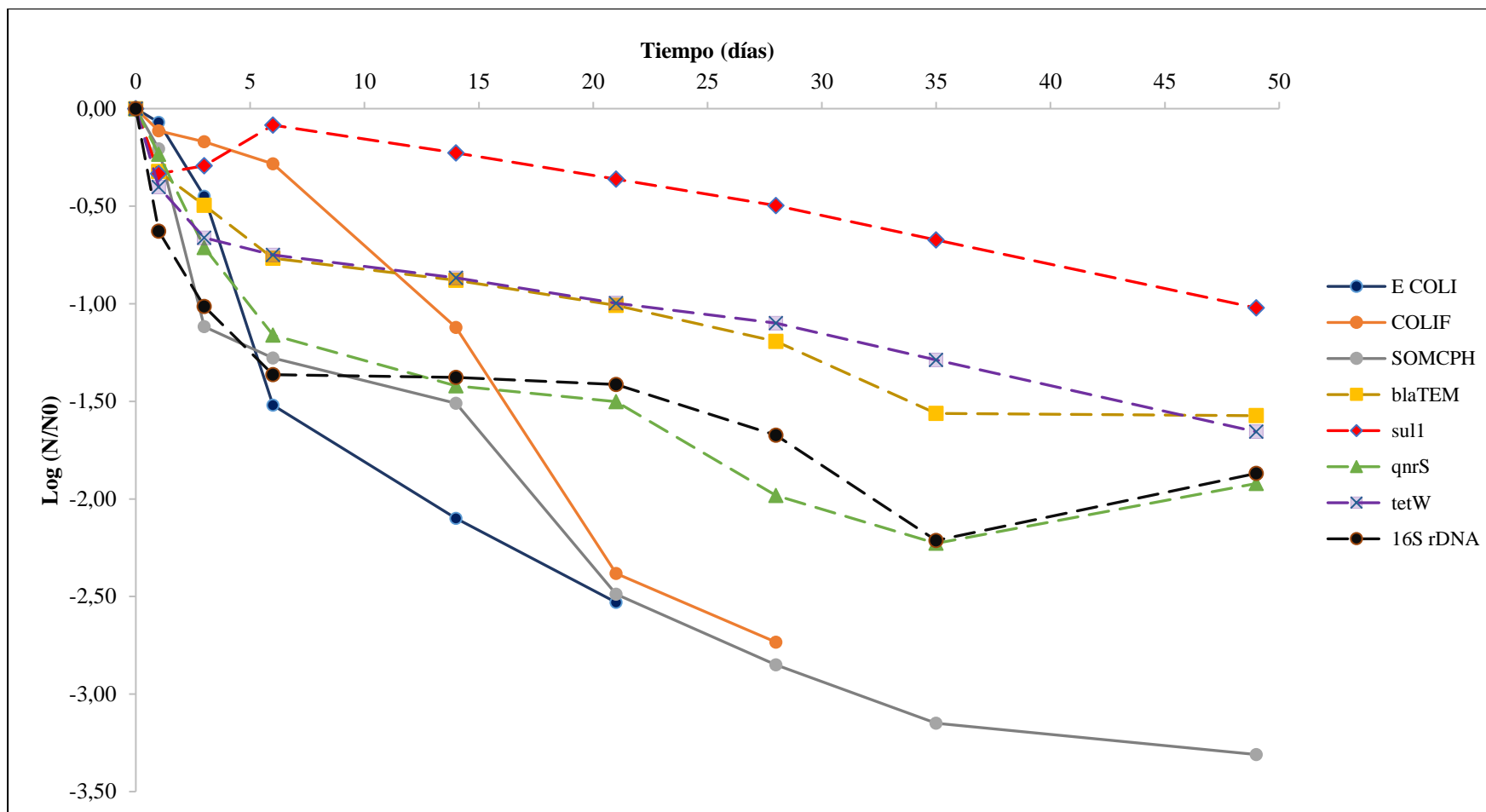


Figura 9. Inactivación térmica de la gallinaza con tamo (T3) durante 49 días de compostaje.

La figura 10 representa la inactivación de los indicadores microbiológicos y de los ARGs, en el tratamiento de la gallinaza con bacterias (T4) durante 49 días de compostaje. Se observó que las bacterias *E.coli* y coliformes llegaron a su inactivación al llegar al día 14, mientras que los bacteriófagos alcanzaron una resistencia mayor hasta el día 35.

En el caso de los ARGs, el gen que alcanzó una menor inactivación fue *sul1* con un valor de -1,24 log (N/N0) al día 49, sin embargo al día 3 se observó buena resistencia de inactivación pero que fue disminuyendo al llegar al día 49. Posteriormente los genes *tetW* y *bla_{TEM}* presentaron valores similares aproximadamente -1,71 log (N/N0), en el caso de *bla_{TEM}* al día 21 se observó una menor inactivación pero al llegar al día 49 su resistencia disminuyó. En cambio los genes 16S rDNA y *qnrS* mostraron una mayor inactivación, el gen 16S rDNA tuvo un valor de -2,06 log (N/N0), mientras que el *qnrS* fue de -2,22 log (N/N0) al llegar al día 49 siendo el gen *qnrS* con mayor inactivación.

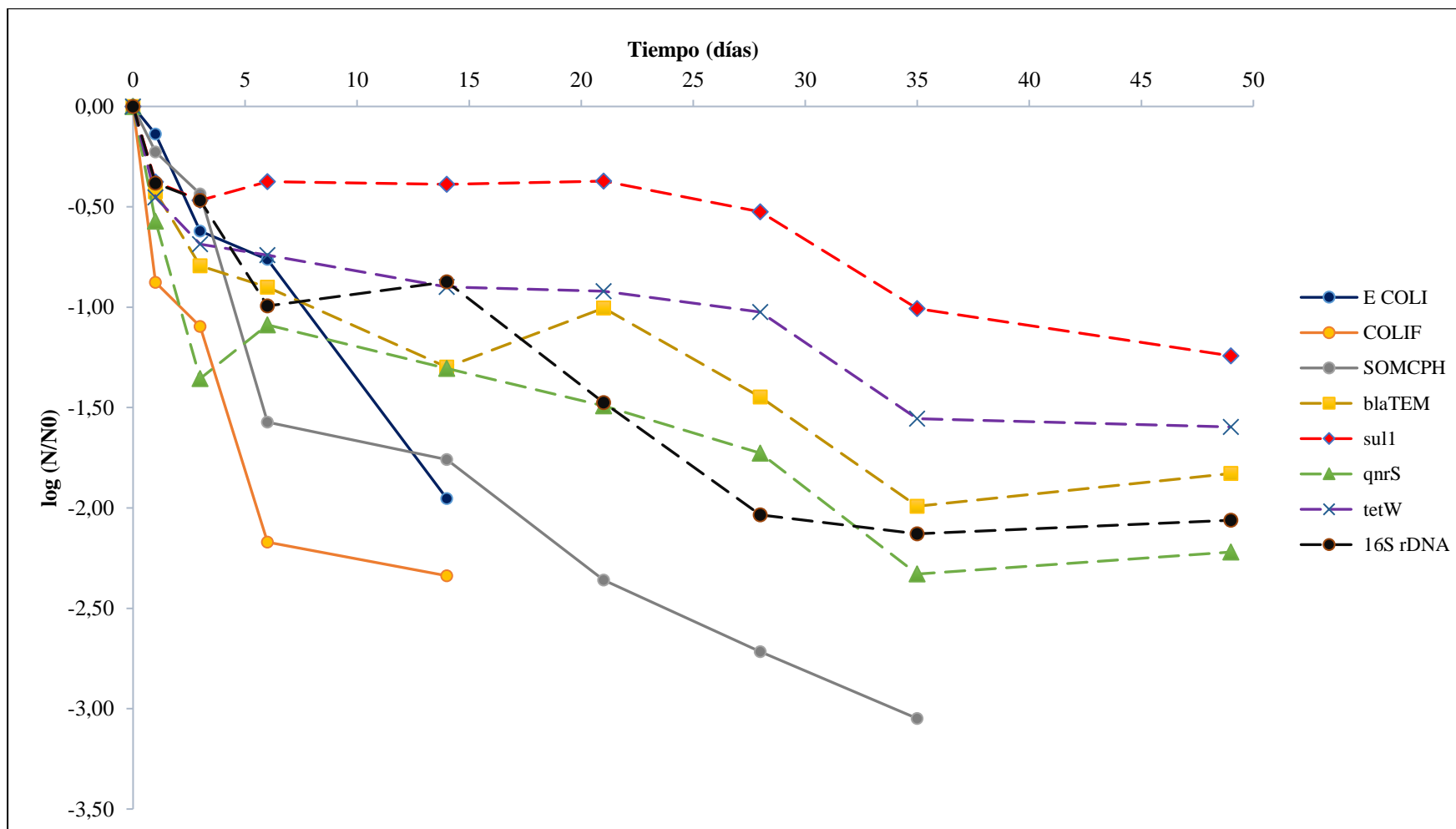


Figura 10. Inactivación térmica de la gallinaza con bacterias (T4) durante 49 días de compostaje

Tabla 12. Parámetro cinético de inactivación térmica de los indicadores microbiológicos y moleculares en los diferentes tratamientos de compostaje de gallinaza

	Valor D (días)			
	Gallinaza fresca sin aditivo (T1)	Gallinaza con cal (T2)	Gallinaza con tamo (T3)	Gallinaza con bacterias (T4)
<i>E.coli</i>	8,64	5,47	8,40	7,17
Coliformes	10,69	10,57	10,24	5,99
Bacteriófagos	8,97	17,06	21,22	11,48
<i>bla_{TEM}</i>	29,40	30,31	31,14	26,80
<i>sul1</i>	36,55	44,78	47,99	39,44
<i>qnrS</i>	36,36	39,43	25,51	22,08
<i>tetW</i>	48,12	31,74	29,59	30,69
16S rDNA	24,61	22,51	26,21	23,77

El estudio de la cinética de inactivación permitió optimizar el proceso de compostaje tradicional de la gallinaza aplicando diferentes tratamientos con el fin de garantizar una mayor reducción de la población microbiana contaminante a una temperatura constante de 50°C. En el caso del tratamiento de la gallinaza sin aditivo; en *E. coli* el tiempo de reducción decimal o valor D fue de 8,64 días en coliformes el valor D fue de 10,69 días y en bacteriófagos el valor D fue de 8,97 días, tal como se aprecia en la tabla 11, es decir, la *E. coli* es la bacteria con mayor inactivación en este tratamiento a diferencia de las coliformes que su cinética de inactivación conlleva más tiempo. Mientras que en los ARGs, se observa que los genes *bla_{TEM}* y 16S rDNA obtuvieron menores tiempos de reducción decimal aproximadamente de 29,40 y 24,61 días; seguidamente de los genes *sul1* y *qnrS* con valores D 36,55 y 36,36 y finalmente el *tetW* con un mayor tiempo de reducción decimal de 48,12 días, es decir, son propensos a mayor inactivación *bla_{TEM}* y 16S rDNA a diferencia de *tetW* que tiene una gran persistencia durante todo el proceso de compostaje

En el caso del tratamiento de la gallinaza con cal; en *E. coli* el tiempo de reducción decimal o valor D fue de 5,47 días, en coliformes el valor D fue de 10,57 y en bacteriófagos el valor D fue de 17,06 días, de tal manera que los bacteriófagos son los que mayor persistencia tienen en este tratamiento al tener un mayor tiempo de inactivación. Se observa que el gen 16S rDNA obtuvo un menor tiempo de reducción decimal fue de 22,51 días; seguidamente de los genes *blaTEM* y *tetW* con valores D aproximadamente de 30,31 días y 31,74 días. En cambio los genes *qnrS* y *sulI* mostraron mayores tiempos de reducción fueron de 39,43 y 44,78 días.

En el caso del tratamiento de la gallinaza con tamo; nuevamente se observa que los bacteriófagos siguen presentando un mayor tiempo de reducción siendo así, los que más se demoren en su inactivación durante todo el tratamiento, su valor D fue de 21,22 días. Aquí los genes *qnrS* y 16S rDNA obtuvieron menores tiempos de reducción decimal aproximadamente de 25,51 y 26,21 días; seguidamente del gen *tet* con un valor de 29,59 días. En cambio los genes *sulI* y *blaTEM* mostraron mayores tiempos de reducción que fueron de 31,14 y 47,99 días.

Por último, para del tratamiento de la gallinaza con bacterias; los coliformes son los que presentaron una mayor inactivación en todo el proceso su valor D fue de 5,59 días, a diferencia de los bacteriófagos que han sido los más persistentes dentro de las bacterias de resistencia. El gen con menor tiempo de reducción decimal fue *qnrS* con un valor de 22,08 días. En cambio los genes *tetW* y *sulI* mostraron mayores tiempos de reducción que fueron de 30,69 y 39,44 días, hay que mencionar que el gen con mayor tiempo de reducción ha sido el último mencionado, debido a su mayor persistencia presentando en todos los tratamientos.

3.1.1. Verificación de Hipótesis

Hi: El compostaje tradicional de gallinaza puede reducir significativamente los niveles de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos.

Si bien, estadísticamente las abundancias de ARGs y de microorganismos se reducen de forma significativa, la presencia de ARGs al terminar los procesos de compostaje tradicional sigue siendo alta, por lo que podría representar una vía de diseminación de estos contaminantes a lo largo de la cadena alimentaria.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se evaluó la persistencia de los indicadores microbiológicos *E.coli*, coliformes totales y colifagos somáticos, durante 49 días de compostaje de la gallinaza. En el caso de *E. coli* se presentó una mayor resistencia en los tratamientos T2 (cal) y T4 (bacteria) hasta el día 21, los coliformes totales presentaron densidades elevadas de microorganismos y una resistencia hasta el día 28 en los tratamientos T2 (cal) y T3 (tamo); mientras que los bacteriófagos mostraron una elevada resistencia que superó los 49 días de compostaje en los tratamientos T2 (cal) y T3 (tamo).

Se evaluó la persistencia de cinco genes de resistencia a antibióticos (*sulI*, *bla_{TEM}*, *qnrS*, *ermB* y *tetW*), por medio de PCR cuantitativa (qPCR) y del gen 16S rDNA en muestras del compostaje del estiércol de la gallina durante 49 días de compostaje; en donde en todas las muestras no se detectó el gen *ermB*. Por otro lado el gen con mayor abundancia fue el gen de resistencia a betalactámicos *bla_{TEM}* en los tratamientos T1 (sin aditivo) T2 (cal) y T4 (bacterias); mientras que en el tratamiento T3 (tamo) fue el gen *qnrS*.

Se analizó las cinéticas de inactivación de los indicadores microbiológicos y moleculares para cada tratamiento de compostaje. En el caso de los indicadores microbiológicos *E.coli* y coliformes presentaron una rápida resistencia de inactivación, mientras que los bacteriófagos obtuvieron una lenta resistencia de inactivación. El gen que alcanzó una rápida inactivación fue *sulI* en los tratamientos T2 (cal), T3 (tamo) y T4 (bacteria) y *tetW* en el tratamiento T1 (sin aditivo). En cambio el gen que mostro una lenta inactivación fue 16S rDNA en los tratamientos T1 (sin aditivo) y T2 (cal) y *qnrS* en los tratamientos T3 (tamo) y T4 (bacterias).

4.2. Recomendaciones

El inadecuado uso de los antibióticos en las gallinas ponedoras ha desencadenado un enorme problema en la formación de bacterias resistentes a los antibióticos en el estiércol de estas aves, por lo cual es considerable recomendar que al momento de realizar el compostaje de gallinaza se utilice aditivos específicos que ayuden a disminuir con mayor rapidez la densidad bacteriana en este tipo de abono orgánico, para así evitar una contaminación del suelo y afectar el microbiota del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2012). *PCR en tiempo real*. 175–202. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- Amarasiri, M., Kitajima, M., Nguyen, T. H., Okabe, S., & Sano, D. (2017). Bacteriophage removal efficiency as a validation and operational monitoring tool for virus reduction in wastewater reclamation: Review. In *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.035>
- Barquero, M. S., Jiménez, L. M. C., Jiménez, K. B., & Araya, R. A. (2012). Implementación de dos métodos de recuento en placa para la detección de colifagos somáticos, aportes a las metodologías estándar. *Revista Peruana de Biología*, 19(3), 335–340. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i3.1050>
- Ben, W., Wang, J., Pan, X., & Qiang, Z. (2017). Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China. *Chemosphere*, 167, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.013>
- Berglund, B., Khan, G. A., Lindberg, R., Fick, J., & Lindgren, P. E. (2014). Abundance and dynamics of antibiotic resistance genes and integrons in lake sediment microcosms. *PLoS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108151>
- Calero-Cáceres, W., Melgarejo, A., Colomer-Lluch, M., Stoll, C., Lucena, F., Jofre, J., & Muniesa, M. (2014). Sludge As a Potential Important Source of Antibiotic Resistance Genes in Both the Bacterial and Bacteriophage Fractions. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/es501851s>
- Calero-Cáceres, W., Méndez, J., Martín-Díaz, J., & Muniesa, M. (2017). The occurrence of antibiotic resistance genes in a Mediterranean river and their persistence in the riverbed sediment. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.035>
- Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2016). Persistence of naturally occurring

antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>

Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., Morrison, M., Al, C. E. T., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. 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* □. 73(14), 4407–4416. <https://doi.org/10.1128/AEM.02799-06>

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

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

De Dios, T., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). PCR Y PCR en tiempo real. *Rev. Inv.Disc.*, 2, 70–78. <http://dl.acm.org/citation.cfm?id=1854369>

Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 8, 49–61. <https://doi.org/10.2147/IDR.S55778>

European Lean Association. (2009). *Guía Práctica sobre el uso de la cal en la prevención y control de la gripe aviar, fiebre aftosa y otras enfermedades infecciosas*. https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/cal.pdf

EPA/625/R-92/013 Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge Control of Pathogens and Vector Attraction, Environmental Regulations and Technology 498 (2003). [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(99\)80035-4](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(99)80035-4)

Fuccz, J., Gómez, R., Cárdenas, M., & Campos, C. (2007). Comportamiento De Coliformes Fecales Como Indicadores Bacterianos De Contaminación Fecal En Diferentes Mezclas De Biosólido Y Estériles Utilizados Para La Restauración Ecológica De La Cantera Soratama, Bogotá. *Universitas Scientiarum*, 12(Edición Especial II), 111–119.

- Huerta Muñoz, E., & Cruz Hernández, J. (2018). Efectos de los abonos orgánicos en el crecimiento de plantas de geranio y belén. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 4(2), 44–53. <https://doi.org/10.30973/aap/2018.4.2/3>
- Lachmayr, K. L., Cavanaugh, C. M., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., & Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific tem β -lactamase (blatem) genes in a wastewater stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 203–211. <https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08>
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., 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*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01682-13>
- Mathew, A. G. (2012). Real-Time PCR. In *Handbook of Food Safety Engineering*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781444355321.ch10>
- McEachran, A. D., Blackwell, B. R., Hanson, J. D., Wooten, K. J., Mayer, G. D., Cox, S. B., & Smith, P. N. (2015). Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: Aerial transport from cattle feed yards via particulate matter. *Environmental Health Perspectives*, 123(4). <https://doi.org/10.1289/ehp.1408555>
- Mercedes, N., Larrea-murrell, J. A., Rojas-badía, M. M., Romeu-álvarez, B., & Heydrich-pérez, M. R. M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- Naranjo, E. (2013). *APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS PARA ACELERAR LA TRANSFORMACIÓN DE DESECHOS ORGÁNICOS EN COMPOST* [tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio UTA. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/5310/1/Tesis-52>
Ingeniería Agronómica -CD 173.pdf

- Périchon, B., Courvalin, P., & Stratton, C. W. (2019). Antibiotic resistance. In *Encyclopedia of Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02385-0>
- Pikkemaat, M. G., Yassin, H., van der Fels-Klerx, H. J., & Berendsen, B. J. A. (2016). Antibiotic Residues and Resistance in the Environment. *RIKILT Report 2016.009.*, 32. <https://doi.org/10.18174/388253>
- Proia, L., Anzil, A., Subirats, J., Borrego, C., Farrè, M., Llorca, M., Balcázar, J. L., & Servais, P. (2018). Antibiotic resistance along an urban river impacted by treated wastewaters. *Science of the Total Environment*, 628–629, 453–466. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.083>
- Pullés, R., & Pullés, M. R. (2014). Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en cuba. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 45(1), 25–36. https://www.researchgate.net/publication/273748351_Microorganismos_Indicadores_de_la_Calidad_del_Agua_Potable_en_Cuba
- Ricke, S. C., & Gast, R. K. (2017). *Producing Safe Eggs. Microbial Ecology of Salmonella* (1st.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802582-6.00016-1>
- Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Thi Ngoc, P., Van Boeckel, T. P., & Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rodríguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sanchez-Melsi, A. S., Borrego, C. M., Barcel, D., & Luis Balcázar, J. (2015). *Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>
- Rodríguez, N., McLaughlin, M., & Pennock, D. (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. In *Organizacion de las Naciones Unidas para la*

alimentacion y la agricultura FAO.
<http://www.fao.org/3/I9183ES/i9183es.pdf>

Roman, P., Martínez, M. M., & Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor*.

San Millan, A. (2018). Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends in Microbiology*.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>

Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., & Calero-Cáceres, W. (2019). Antibiotic resistance of Salmonella strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jam.14562>

Sánchez, N. (2019). Uso, abuso y mal uso de los antibióticos. *Revista Enfermería CyL*, 11(1), 181–188.

Tien, Y.-C., 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.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>

Valle, M., & Calero, W. (2019). *Validación de técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos* [tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio UTA.
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30546/1/BQ%20209.pdf>.

Vásquez, S., Legnani, M., & O'Neill, S. (2013). *Importancia de los Coliformes en los Alimentos*.
https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/importancia_de_los_coliformes_en_los_alimentos.pdf

Walsh, F., Ingenfeld, A., Zampiccoli, M., Hilber-Bodmer, M., Frey, J. E., & Duffy, B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 150–155.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.011>

- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1670). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., & Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>
- Zhang, Y. J., Hu, H. W., Gou, M., Wang, J. T., Chen, D., & He, J. Z. (2017). Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics. *Environmental Pollution*, 231, 1621–1632. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.074>
- Zhao, X., Wang, J., Zhu, L., Ge, W., & Wang, J. (2017). Environmental analysis of typical antibiotic-resistant bacteria and ARGs in farmland soil chronically fertilized with chicken manure. *Science of The Total Environment*, 593, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.062>
- Zhu, Y.-G., Johnson, T. A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R. D., Hashsham, S. A., & Tiedje, J. M. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.1222743110>

ANEXOS

Anexo A. Valores de los ensayos de qPCR realizados en las muestras de gallinaza.

Tabla 13. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza fresca sin aditivo

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	Ct<30,5	blaTEM $y = -0.3611x + 13.658$		GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	
									log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR			GC en muestra inicial
0	26,13	25,84	25,99	0,21	200,00	0,22	0,06	9,00	4,22	1,67E+04	1,85E+03	3,71E+05	5,93E+06	6,77
1	26,73	25,78	26,26	0,67	200,00	0,22	0,07	9,00	4,01	1,01E+04	1,13E+03	2,25E+05	3,20E+06	6,51
3	26,05	26,76	26,41	0,50	200,00	0,22	0,07	9,00	4,25	1,78E+04	1,98E+03	3,96E+05	5,54E+06	6,74
6	26,66	26,92	26,79	0,18	200,00	0,21	0,08	9,00	4,03	1,07E+04	1,19E+03	2,39E+05	2,94E+06	6,47
14	27,52	27,95	27,74	0,30	200,00	0,22	0,08	9,00	3,72	5,25E+03	5,84E+02	1,17E+05	1,47E+06	6,17
21	28,16	28,30	28,23	0,10	200,00	0,22	0,09	9,00	3,49	3,09E+03	3,43E+02	6,86E+04	7,59E+05	5,88
28	29,95	29,12	29,54	0,59	200,00	0,22	0,09	9,00	2,84	6,97E+02	7,74E+01	1,55E+04	1,82E+05	5,26
35	29,28	29,75	29,52	0,33	200,00	0,23	0,11	9,00	3,08	1,22E+03	1,35E+02	2,70E+04	2,54E+05	5,41
49	29,99	29,83	29,91	0,11	200,00	0,23	0,11	9,00	2,83	6,74E+02	7,49E+01	1,50E+04	1,36E+05	5,13

Ct<34,5 sul 1 $y = -0,3203x + 12.884$

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	22,47	22,39	22,43	0,06	200,00	0,22	0,06	9,00	5,69	4,86E+05	5,40E+04	1,08E+07	1,73E+08	8,24
1	22,55	22,18	22,37	0,26	200,00	0,22	0,07	9,00	5,66	4,58E+05	5,09E+04	1,02E+07	1,45E+08	8,16
3	22,28	22,65	22,47	0,26	200,00	0,22	0,07	9,00	5,75	5,59E+05	6,22E+04	1,24E+07	1,74E+08	8,24
6	21,52	21,85	21,69	0,23	200,00	0,21	0,08	9,00	5,99	9,80E+05	1,09E+05	2,18E+07	2,68E+08	8,43
14	20,18	20,29	20,24	0,08	200,00	0,22	0,08	9,00	6,42	2,63E+06	2,92E+05	5,85E+07	7,37E+08	8,87
21	20,95	19,65	20,30	0,92	200,00	0,22	0,09	9,00	6,17	1,49E+06	1,66E+05	3,32E+07	3,67E+08	8,56
28	20,63	20,85	20,74	0,16	200,00	0,22	0,09	9,00	6,28	1,89E+06	2,10E+05	4,20E+07	4,93E+08	8,69
35	21,08	20,80	20,94	0,20	200,00	0,23	0,11	9,00	6,13	1,36E+06	1,51E+05	3,01E+07	2,83E+08	8,45
49	21,31	21,41	21,36	0,07	200,00	0,23	0,11	9,00	6,06	1,14E+06	1,27E+05	2,54E+07	2,30E+08	8,36

Ct<30,5 qnrS y = -0.3326x + 12.771

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	33,10	33,59	33,35	0,35	200,00	0,22	0,06	9,00	1,76	5,78E+01	6,42E+00	1,28E+03	2,05E+04	4,31
1	35,35	35,11	35,23	0,17	200,00	0,22	0,07	9,00	1,01	1,03E+01	1,15E+00	2,29E+02	3,26E+03	3,51
3	35,87	35,08	35,48	0,56	200,00	0,22	0,07	9,00	0,84	6,93E+00	7,70E-01	1,54E+02	2,15E+03	3,33
6	35,91	35,71	35,81	0,14	200,00	0,21	0,08	9,00	0,83	6,72E+00	7,47E-01	1,49E+02	1,84E+03	3,27
14	36,14	36,02	36,08	0,08	200,00	0,22	0,08	9,00	0,75	5,63E+00	6,26E-01	1,25E+02	1,58E+03	3,20
21	36,56	36,19	36,38	0,26	200,00	0,22	0,09	9,00	0,61	4,08E+00	4,54E-01	9,08E+01	1,00E+03	3,00
28	37,12	36,76	36,94	0,25	200,00	0,22	0,09	9,00	0,42	2,66E+00	2,96E-01	5,91	6,94E+02	2,84

												E+01		
35	37,33	36,81	37,07	0,37	200,00	0,23	0,11	9,00	0,36	2,26E+00	2,52E-01	5,03E+01	4,74E+02	2,68
49	36,87	36,43	36,65	0,31	200,00	0,23	0,11	9,00	0,51	3,22E+00	3,58E-01	7,16E+01	6,48E+02	2,81

Ct<30,5 tetW y = -0.2949x + 12.181

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	18,94	18,99	18,97	0,04	200,00	0,22	0,06	9,00	6,60	3,94E+06	4,38E+05	8,76E+07	1,40E+09	9,15
1	19,01	18,24	18,63	0,54	200,00	0,22	0,07	9,00	6,57	3,76E+06	4,18E+05	8,35E+07	1,19E+09	9,07
3	18,65	18,90	18,78	0,18	200,00	0,22	0,07	9,00	6,68	4,80E+06	5,33E+05	1,07E+08	1,49E+09	9,17
6	19,54	18,53	19,04	0,71	200,00	0,21	0,08	9,00	6,42	2,62E+06	2,91E+05	5,83E+07	7,19E+08	8,86
14	19,71	20,33	20,02	0,44	200,00	0,22	0,08	9,00	6,37	2,34E+06	2,60E+05	5,19E+07	6,54E+08	8,82
21	20,19	20,08	20,14	0,08	200,00	0,22	0,09	9,00	6,23	1,69E+06	1,87E+05	3,75E+07	4,15E+08	8,62
28	20,58	20,17	20,38	0,29	200,00	0,22	0,09	9,00	6,11	1,29E+06	1,44E+05	2,88E+07	3,38E+08	8,53
35	20,76	20,58	20,67	0,13	200,00	0,23	0,11	9,00	6,06	1,15E+06	1,27E+05	2,54E+07	2,39E+08	8,38
49	20,77	20,73	20,75	0,03	200,00	0,23	0,11	9,00	6,06	1,14E+06	1,26E+05	2,53E+07	2,29E+08	8,36

Ct<31 16S rADN y = -0.3384x + 12.333

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	22,75	22,82	22,79	0,05	200,00	0,22	0,06	9,00	4,63	4,31E+04	4,79E+03	9,58E+05	1,53E+07	7,19
1	23,07	23,71	23,39	0,45	200,00	0,22	0,07	9,00	4,53	3,36E+04	3,73E+03	7,46E+05	1,06E+07	7,03

3	24,11	24,69	24,40	0,41	200,00	0,22	0,07	9,00	4,17	1,49E+04	1,66E+03	3,32E+05	4,64E+06	6,67
6	23,44	23,69	23,57	0,18	200,00	0,21	0,08	9,00	4,40	2,52E+04	2,80E+03	5,59E+05	6,90E+06	6,84
14	23,62	24,33	23,98	0,50	200,00	0,22	0,08	9,00	4,34	2,19E+04	2,43E+03	4,86E+05	6,13E+06	6,79
21	26,51	27,86	27,19	0,95	200,00	0,22	0,09	9,00	3,36	2,30E+03	2,56E+02	5,11E+04	5,66E+05	5,75
28	30,44	31,29	30,87	0,60	200,00	0,22	0,09	9,00	2,03	1,08E+02	1,20E+01	2,39E+03	2,81E+04	4,45
35	30,71	30,83	30,77	0,08	200,00	0,23	0,11	9,00	1,94	8,72E+01	9,69E+00	1,94E+03	1,82E+04	4,26
49	33,82	33,12	33,47	0,49	200,00	0,23	0,11	9,00	0,89	7,73E+00	8,59E-01	1,72E+02	1,56E+03	3,19

Tabla 14. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con cal

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	Ct<30,5	blaTEM $y = -0.3611x + 13.658$				
									log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0,00	25,66	25,36	25,51	0,21	200,00	0,22	0,07	9,00	4,39	2,47E+04	2,74E+03	5,48E+05	7,74E+06	6,89
1,00	25,31	25,52	25,42	0,15	200,00	0,21	0,07	9,00	4,52	3,30E+04	3,67E+03	7,33E+05	9,83E+06	6,99
3,00	26,84	27,17	27,01	0,23	200,00	0,22	0,08	9,00	3,97	9,25E+03	1,03E+03	2,06E+05	2,60E+06	6,42
6,00	27,32	27,05	27,19	0,19	200,00	0,21	0,08	9,00	3,79	6,21E+03	6,89E+02	1,38E+05	1,77E+06	6,25
14,00	27,95	27,73	27,84	0,16	200,00	0,21	0,08	9,00	3,57	3,67E+03	4,08E+02	8,17E+04	1,04E+06	6,02
21,00	28,38	28,03	28,21	0,25	200,00	0,22	0,08	9,00	3,41	2,57E+03	2,86E+02	5,71E+04	7,19E+05	5,86
28,00	28,41	28,12	28,27	0,21	200,00	0,22	0,10	9,00	3,40	2,51E+03	2,79E+02	5,57E+04	5,50E+05	5,74
35,00	28,96	29,21	29,09	0,18	200,00	0,23	0,14	9,00	3,20	1,59E+03	1,76E+02	3,53E+04	2,48E+05	5,39
49,00	28,86	29,47	29,17	0,43	200,00	0,23	0,14	9,00	3,24	1,72E+03	1,92E+02	3,83E+04	2,67E+05	5,43

									Ct<34,5	sul 1 y=-0,3203x + 12.884				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	19,06	20,11	19,59	0,74	200,00	0,22	0,07	9,00	6,78	6,01E+06	6,68E+05	1,34E+08	1,89E+09	9,28
1	19,18	19,74	19,46	0,40	200,00	0,21	0,07	9,00	6,74	5,50E+06	6,12E+05	1,22E+08	1,64E+09	9,21
3	19,71	19,81	19,76	0,07	200,00	0,22	0,08	9,00	6,57	3,72E+06	4,14E+05	8,27E+07	1,05E+09	9,02
6	20,14	20,04	20,09	0,07	200,00	0,21	0,08	9,00	6,43	2,71E+06	3,01E+05	6,02E+07	7,74E+08	8,89
14	20,26	20,31	20,29	0,04	200,00	0,21	0,08	9,00	6,39	2,48E+06	2,76E+05	5,51E+07	7,04E+08	8,85
21	19,30	20,61	19,96	0,93	200,00	0,22	0,08	9,00	6,70	5,04E+06	5,60E+05	1,12E+08	1,41E+09	9,15
28	19,56	20,68	20,12	0,79	200,00	0,22	0,10	9,00	6,62	4,16E+06	4,62E+05	9,24E+07	9,12E+08	8,96
35	20,64	20,76	20,70	0,08	200,00	0,23	0,14	9,00	6,27	1,88E+06	2,08E+05	4,17E+07	2,93E+08	8,47
49	19,91	20,12	20,02	0,15	200,00	0,23	0,14	9,00	6,51	3,21E+06	3,57E+05	7,14E+07	4,97E+08	8,70
									Ct<30,5	qnrS y = -0.3326x + 12.771				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	33,84	33,49	33,67	0,25	200,00	0,22	0,07	9,00	1,52	3,28E+01	3,64E+00	7,29E+02	1,03E+04	4,01
1	34,42	34,23	34,33	0,13	200,00	0,21	0,07	9,00	1,32	2,10E+01	2,34E+00	4,67E+02	6,27E+03	3,80
3	35,14	36,08	35,61	0,66	200,00	0,22	0,08	9,00	1,08	1,21E+01	1,35E+00	2,69E+02	3,41E+03	3,53
6	35,91	35,93	35,92	0,01	200,00	0,21	0,08	9,00	0,83	6,72E+00	7,47E-01	1,49E+02	1,92E+03	3,28

14	36,14	35,79	35,97	0,25	200,00	0,21	0,08	9,00	0,75	5,63E+00	6,26E-01	1,25E+02	1,60E+03	3,20
21	36,28	36,09	36,19	0,13	200,00	0,22	0,08	9,00	0,70	5,06E+00	5,62E-01	1,12E+02	1,42E+03	3,15
28	35,75	36,76	36,26	0,71	200,00	0,22	0,10	9,00	0,88	7,60E+00	8,44E-01	1,69E+02	1,67E+03	3,22
35	36,33	35,02	35,68	0,93	200,00	0,23	0,14	9,00	0,69	4,87E+00	5,41E-01	1,08E+02	7,60E+02	2,88
49	36,98	35,43	36,21	1,10	200,00	0,23	0,14	9,00	0,47	2,96E+00	3,29E-01	6,58E+01	4,58E+02	2,66

Ct<30,5 **tetW y = -0.2949x + 12.181**

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	16,53	16,93	16,73	0,28	200,00	0,22	0,07	9,00	7,31	2,02E+07	2,25E+06	4,50E+08	6,35E+09	9,80
1	17,15	19,84	18,50	1,90	200,00	0,21	0,07	9,00	7,12	1,33E+07	1,48E+06	2,95E+08	3,96E+09	9,60
3	19,38	19,73	19,56	0,25	200,00	0,22	0,08	9,00	6,47	2,92E+06	3,25E+05	6,50E+07	8,22E+08	8,92
6	19,52	19,93	19,73	0,29	200,00	0,21	0,08	9,00	6,42	2,66E+06	2,95E+05	5,91E+07	7,59E+08	8,88
14	20,12	19,77	19,95	0,25	200,00	0,21	0,08	9,00	6,25	1,77E+06	1,97E+05	3,93E+07	5,01E+08	8,70
21	20,39	20,41	20,40	0,01	200,00	0,22	0,08	9,00	6,17	1,47E+06	1,64E+05	3,27E+07	4,12E+08	8,61
28	20,55	20,67	20,61	0,08	200,00	0,22	0,10	9,00	6,12	1,32E+06	1,47E+05	2,93E+07	2,90E+08	8,46
35	20,98	20,58	20,78	0,28	200,00	0,23	0,14	9,00	5,99	9,86E+05	1,10E+05	2,19E+07	1,54E+08	8,19
49	20,78	21,05	20,92	0,19	200,00	0,23	0,14	9,00	6,05	1,13E+06	1,26E+05	2,51E+07	1,75E+08	8,24

Ct<31 **16S y = -0.3384x + 12.333**

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0,00	25,88	25,27	25,58	0,43	200,00	0,22	0,07	9,00	3,58	3,76E+03	4,18E+02	8,36E+04	1,18E+06	6,07
1,00	26,18	26,81	26,50	0,45	200,00	0,21	0,07	9,00	3,47	2,98E+03	3,31E+02	6,61E+04	8,87E+05	5,95
3,00	26,83	27,69	27,26	0,61	200,00	0,22	0,08	9,00	3,25	1,79E+03	1,99E+02	3,99E+04	5,05E+05	5,70
6,00	27,34	27,34	27,34	0,00	200,00	0,21	0,08	9,00	3,08	1,21E+03	1,34E+02	2,68E+04	3,44E+05	5,54
14,00	29,05	28,26	28,66	0,56	200,00	0,21	0,08	9,00	2,50	3,18E+02	3,53E+01	7,07E+03	9,02E+04	4,96
21,00	29,36	28,74	29,05	0,44	200,00	0,22	0,08	9,00	2,40	2,50E+02	2,78E+01	5,55E+03	6,99E+04	4,84
28,00	29,47	29,38	29,43	0,06	200,00	0,22	0,10	9,00	2,36	2,29E+02	2,55E+01	5,09E+03	5,03E+04	4,70
35,00	29,75	30,83	30,29	0,76	200,00	0,23	0,14	9,00	2,27	1,84E+02	2,05E+01	4,10E+03	2,88E+04	4,46
49,00	30,31	33,12	31,72	1,99	200,00	0,23	0,14	9,00	2,08	1,19E+02	1,32E+01	2,65E+03	1,84E+04	4,27

Tabla 15. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con tamo

									Ct<30,5	blaTEM y = -0.3611x + 13.658					
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	
0	25,66	24,88	25,27	0,55	200,00	0,24	0,08	9,00	4,39	2,47E+04	2,74E+03	5,48E+05	6,52E+06	6,81	
1	26,17	26,34	26,26	0,12	200,00	0,23	0,07	9,00	4,21	1,61E+04	1,79E+03	3,59E+05	4,85E+06	6,69	
3	26,52	26,99	26,76	0,33	200,00	0,22	0,07	9,00	4,08	1,21E+04	1,34E+03	2,68E+05	3,62E+06	6,56	
6	27,32	27,67	27,50	0,25	200,00	0,22	0,07	9,00	3,79	6,21E+03	6,89E+02	1,38E+05	1,86E+06	6,27	
14	27,57	27,73	27,65	0,11	200,00	0,23	0,08	9,00	3,70	5,04E+03	5,60E+02	1,12E+05	1,33E+06	6,13	
21	28,21	27,90	28,06	0,22	200,00	0,23	0,08	9,00	3,47	2,96E+03	3,29E+02	6,58E+04	8,13E+05	5,91	
28	28,18	28,43	28,31	0,18	200,00	0,24	0,10	9,00	3,48	3,04E+03	3,37E+02	6,75E+04	6,73E+05	5,83	
35	28,88	29,16	29,02	0,20	200,00	0,24	0,13	9,00	3,23	1,70E+03	1,88E+02	3,77E+04	2,91E+05	5,46	
49	29,42	29,47	29,45	0,04	200,00	0,22	0,15	9,00	3,03	1,08E+03	1,20E+02	2,41E+04	1,57E+05	5,20	

									Ct<34,5	sul 1 y=-0,3203x + 12.884					
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml	
0	19,45	20,39	19,92	0,66	200,00	0,24	0,08	9,00	6,65	4,51E+06	5,01E+05	1,00E+08	1,19E+09	9,08	

1	20,55	21,86	21,21	0,93	200,00	0,23	0,07	9,00	6,30	2,00E+06	2,23E+05	4,45E+07	6,02E+08	8,78
3	21,12	20,76	20,94	0,25	200,00	0,22	0,07	9,00	6,12	1,32E+06	1,46E+05	2,92E+07	3,95E+08	8,60
6	20,11	20,46	20,29	0,25	200,00	0,22	0,07	9,00	6,44	2,77E+06	3,08E+05	6,16E+07	8,31E+08	8,92
14	20,48	20,62	20,55	0,10	200,00	0,23	0,08	9,00	6,32	2,11E+06	2,34E+05	4,69E+07	5,59E+08	8,75
21	20,99	21,05	21,02	0,04	200,00	0,23	0,08	9,00	6,16	1,45E+06	1,61E+05	3,22E+07	3,98E+08	8,60
28	21,32	21,00	21,16	0,23	200,00	0,24	0,10	9,00	6,06	1,14E+06	1,26E+05	2,52E+07	2,52E+08	8,40
35	21,30	21,41	21,36	0,08	200,00	0,24	0,13	9,00	6,06	1,15E+06	1,28E+05	2,56E+07	1,98E+08	8,30
49	21,70	21,68	21,69	0,01	200,00	0,22	0,15	9,00	5,93	8,58E+05	9,53E+04	1,91E+07	1,24E+08	8,09

Ct<30,5 **qnrS y = -0.3326x + 12.771**

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	31,83	32,27	32,05	0,31	200,00	0,24	0,08	9,00	2,18	1,53E+02	1,70E+01	3,40E+03	4,04E+04	4,61
1	32,72	33,11	32,92	0,28	200,00	0,23	0,07	9,00	1,89	7,73E+01	8,59E+00	1,72E+03	2,32E+04	4,37
3	34,06	34,69	34,38	0,45	200,00	0,22	0,07	9,00	1,44	2,77E+01	3,08E+00	6,16E+02	8,32E+03	3,92
6	35,48	35,93	35,71	0,32	200,00	0,22	0,07	9,00	0,97	9,34E+00	1,04E+00	2,08E+02	2,80E+03	3,45
14	37,16	35,79	36,48	0,97	200,00	0,23	0,08	9,00	0,41	2,58E+00	2,87E-01	5,73E+01	6,83E+02	2,83
21	37,43	36,09	36,76	0,95	200,00	0,23	0,08	9,00	0,32	2,10E+00	2,33E-01	4,66E+01	5,76E+02	2,76
28	38,16	37,46	37,81	0,49	200,00	0,24	0,10	9,00	0,08	1,20E+00	1,33E-01	2,67E+01	2,66E+02	2,42
35	38,21	38,12	38,17	0,06	200,00	0,24	0,13	9,00	0,06	1,15E+00	1,28E-01	2,57E+01	1,98E+02	2,30
49	36,71	37,43	37,07	0,51	200,00	0,22	0,15	9,00	0,56	3,64E+00	4,05E-01	8,09E+01	5,27E+02	2,72

Ct<30,5 **tetW y = -0.2949x + 12.181**

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	16,26	16,93	16,60	0,47	200,00	0,24	0,08	9,00	7,39	2,43E+07	2,70E+06	5,40E+08	6,43E+09	9,81
1	17,71	18,65	18,18	0,66	200,00	0,23	0,07	9,00	6,96	9,08E+06	1,01E+06	2,02E+08	2,73E+09	9,44
3	18,96	19,02	18,99	0,04	200,00	0,22	0,07	9,00	6,59	3,89E+06	4,32E+05	8,64E+07	1,17E+09	9,07
6	19,32	19,25	19,29	0,05	200,00	0,22	0,07	9,00	6,48	3,04E+06	3,38E+05	6,77E+07	9,13E+08	8,96
14	19,25	19,80	19,53	0,39	200,00	0,23	0,08	9,00	6,50	3,19E+06	3,55E+05	7,10E+07	8,45E+08	8,93
21	19,67	20,41	20,04	0,52	200,00	0,23	0,08	9,00	6,38	2,40E+06	2,67E+05	5,33E+07	6,59E+08	8,82
28	19,58	20,67	20,13	0,77	200,00	0,24	0,10	9,00	6,41	2,55E+06	2,84E+05	5,67E+07	5,65E+08	8,75
35	20,04	20,58	20,31	0,38	200,00	0,24	0,13	9,00	6,27	1,87E+06	2,07E+05	4,15E+07	3,20E+08	8,51
49	20,95	21,05	21,00	0,07	200,00	0,22	0,15	9,00	6,00	1,01E+06	1,12E+05	2,24E+07	1,46E+08	8,16

Ct<31 **16S y = -0.3384x + 12.333**

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	22,56	21,00	21,78	1,10	200,00	0,24	0,08	9,00	4,70	5,00E+04	5,55E+03	1,11E+06	1,32E+07	7,12
1	24,19	23,16	23,68	0,73	200,00	0,23	0,07	9,00	4,15	1,40E+04	1,56E+03	3,12E+05	4,21E+06	6,62
3	24,70	24,73	24,72	0,02	200,00	0,22	0,07	9,00	3,97	9,43E+03	1,05E+03	2,10E+05	2,83E+06	6,45
6	25,34	26,34	25,84	0,71	200,00	0,22	0,07	9,00	3,76	5,73E+03	6,36E+02	1,27E+05	1,72E+06	6,23
14	25,12	26,48	25,80	0,96	200,00	0,23	0,08	9,00	3,83	6,80E+03	7,55E+02	1,51E+05	1,80E+06	6,26
21	25,53	26,10	25,82	0,40	200,00	0,23	0,08	9,00	3,69	4,94E+03	5,49E+02	1,10E+05	1,36E+06	6,13
28	26,21	26,34	26,28	0,09	200,00	0,24	0,10	9,00	3,46	2,91E+03	3,23E+02	6,46E+04	6,44E+05	5,81

35	27,31	27,82	27,57	0,36	200,00	0,24	0,13	9,00	3,09	1,23E+03	1,37E+02	2,74E+04	2,12E+05	5,33
49	28,07	27,90	27,99	0,12	200,00	0,22	0,15	9,00	2,83	6,83E+02	7,58E+01	1,52E+04	6,77E+04	4,83

Tabla 16. Resumen del ensayo de la persistencia de los genes (sul1, blaTEM, qnrS, y tetW) y del gen 16S rDNA (Universal) en el tratamiento de gallinaza con bacterias

									Ct<30,5	blaTEM y = -0.3611x + 13.658				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	24,78	24,90	24,84	0,08	200,00	0,24	0,05	9,00	4,71	5,13E+04	5,70E+03	1,14E+06	2,23E+07	7,35
1	25,52	25,71	25,62	0,13	200,00	0,23	0,07	9,00	4,44	2,77E+04	3,08E+03	6,16E+05	8,61E+06	6,93
3	26,99	26,46	26,73	0,37	200,00	0,22	0,07	9,00	3,91	8,16E+03	9,07E+02	1,81E+05	2,67E+06	6,43
6	26,97	27,11	27,04	0,10	200,00	0,21	0,07	9,00	3,92	8,30E+03	9,22E+02	1,84E+05	2,82E+06	6,45
14	27,80	27,98	27,89	0,13	200,00	0,23	0,08	9,00	3,62	4,16E+03	4,63E+02	9,25E+04	1,15E+06	6,06
21	27,14	27,68	27,41	0,38	200,00	0,21	0,06	9,00	3,86	7,21E+03	8,01E+02	1,60E+05	2,56E+06	6,41
28	28,21	28,20	28,21	0,01	200,00	0,24	0,09	9,00	3,47	2,96E+03	3,29E+02	6,58E+04	7,54E+05	5,88
35	29,17	28,75	28,96	0,30	200,00	0,25	0,17	9,00	3,12	1,33E+03	1,48E+02	2,96E+04	1,79E+05	5,25
49	32,37	31,80	32,09	0,40	200,00	0,24	0,18	9,00	1,97	9,32E+01	1,04E+01	2,07E+03	1,16E+04	4,06
									Ct<34,5	sul 1 y=-0,3203x + 12.884				

Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	19,21	20,60	19,91	0,98	200,00	0,24	0,05	9,00	6,73	5,38E+06	5,98E+05	1,20E+08	2,34E+09	9,37
1	20,13	20,87	20,50	0,52	200,00	0,23	0,07	9,00	6,44	2,73E+06	3,03E+05	6,07E+07	8,48E+08	8,93
3	20,58	21,09	20,84	0,36	200,00	0,22	0,07	9,00	6,29	1,96E+06	2,18E+05	4,36E+07	6,42E+08	8,81
6	20,63	20,52	20,58	0,08	200,00	0,21	0,07	9,00	6,28	1,89E+06	2,10E+05	4,20E+07	6,43E+08	8,81
14	20,41	20,25	20,33	0,11	200,00	0,23	0,08	9,00	6,35	2,22E+06	2,47E+05	4,94E+07	6,13E+08	8,79
21	20,59	20,66	20,63	0,05	200,00	0,21	0,06	9,00	6,29	1,95E+06	2,16E+05	4,32E+07	6,92E+08	8,84
28	20,70	20,60	20,65	0,07	200,00	0,24	0,09	9,00	6,25	1,79E+06	1,99E+05	3,99E+07	4,57E+08	8,66
35	21,17	21,41	21,29	0,17	200,00	0,25	0,17	9,00	6,10	1,27E+06	1,41E+05	2,82E+07	1,70E+08	8,23
49	22,24	21,66	21,95	0,41	200,00	0,24	0,18	9,00	5,76	5,76E+05	6,40E+04	1,28E+07	7,18E+07	7,86

									Ct<30,5	qnrS y = -0.3326x + 12.771				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	31,72	31,19	31,46	0,37	200,00	0,24	0,05	9,00	2,22	1,66E+02	1,85E+01	3,70E+03	7,23E+04	4,86
1	32,40	33,11	32,76	0,50	200,00	0,23	0,07	9,00	1,99	9,88E+01	1,10E+01	2,20E+03	3,07E+04	4,49
3	35,81	34,69	35,25	0,79	200,00	0,22	0,07	9,00	0,86	7,25E+00	8,06E-01	1,61E+02	2,38E+03	3,38
6	33,69	35,93	34,81	1,58	200,00	0,21	0,07	9,00	1,57	3,68E+01	4,09E+00	8,18E+02	1,25E+04	4,10
14	34,19	35,79	34,99	1,13	200,00	0,23	0,08	9,00	1,40	2,51E+01	2,79E+00	5,57E+02	6,92E+03	3,84

21	35,32	36,09	35,71	0,54	200,00	0,21	0,06	9,00	1,02	1,06E+01	1,17E+00	2,35E+02	3,75E+03	3,57
28	35,24	37,46	36,35	1,57	200,00	0,24	0,09	9,00	1,05	1,12E+01	1,25E+00	2,49E+02	2,86E+03	3,46
35	36,71	37,12	36,92	0,29	200,00	0,25	0,17	9,00	0,56	3,64E+00	4,05E-01	8,09E+01	4,89E+02	2,69
49	36,44	36,50	36,47	0,04	200,00	0,24	0,18	9,00	0,65	4,48E+00	4,98E-01	9,95E+01	5,58E+02	2,75

									Ct<30,5	tetW $y = -0.2949x + 12.181$				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	16,26	16,33	16,30	0,05	200,00	0,24	0,05	9,00	7,39	2,43E+07	2,70E+06	5,40E+08	1,06E+10	10,02
1	17,13	17,58	17,36	0,32	200,00	0,23	0,07	9,00	7,13	1,35E+07	1,50E+06	2,99E+08	4,18E+09	9,62
3	18,95	17,71	18,33	0,88	200,00	0,22	0,07	9,00	6,59	3,91E+06	4,35E+05	8,70E+07	1,28E+09	9,11
6	18,42	18,47	18,45	0,04	200,00	0,21	0,07	9,00	6,75	5,61E+06	6,23E+05	1,25E+08	1,91E+09	9,28
14	18,38	19,04	18,71	0,47	200,00	0,23	0,08	9,00	6,76	5,76E+06	6,40E+05	1,28E+08	1,59E+09	9,20
21	19,56	18,78	19,17	0,55	200,00	0,21	0,06	9,00	6,41	2,59E+06	2,87E+05	5,75E+07	9,20E+08	8,96
28	19,50	18,60	19,05	0,64	200,00	0,24	0,09	9,00	6,43	2,69E+06	2,99E+05	5,99E+07	6,86E+08	8,84
35	19,27	20,78	20,03	1,07	200,00	0,25	0,17	9,00	6,50	3,15E+06	3,50E+05	7,00E+07	4,23E+08	8,63
49	22,78	21,50	22,14	0,91	200,00	0,24	0,18	9,00	5,46	2,91E+05	3,23E+04	6,46E+06	3,62E+07	7,56

									Ct<31	16S y = -0.3384x + 12.333				
Día	Ct1	Ct2	Media Ct	Desv. Est	Volumen aforo (ul)	Gramos muestra (g)	Peso Seco (g)	Volumen de reacción TaqMan (ul)	log num. copias gen	num copias gen/tubo qPCR	num GC/ul tubo qPCR	GC en muestra inicial	GC/g o ml de muestra	log CG/g o ml
0	20,90	18,56	19,73	1,65	200,00	0,24	0,05	9,00	5,26	1,82E+05	2,02E+04	4,05E+06	7,92E+07	7,90
1	19,78	20,16	19,97	0,27	200,00	0,23	0,07	9,00	5,64	4,36E+05	4,84E+04	9,69E+06	1,35E+08	8,13
3	19,93	20,75	20,34	0,58	200,00	0,22	0,07	9,00	5,59	3,88E+05	4,31E+04	8,62E+06	1,27E+08	8,10
6	21,37	22,74	22,06	0,97	200,00	0,21	0,07	9,00	5,10	1,26E+05	1,40E+04	2,81E+06	4,30E+07	7,63
14	20,93	21,70	21,32	0,54	200,00	0,23	0,08	9,00	5,25	1,78E+05	1,98E+04	3,95E+06	4,91E+07	7,69
21	22,70	24,79	23,75	1,48	200,00	0,21	0,06	9,00	4,65	4,48E+04	4,98E+03	9,96E+05	1,59E+07	7,20
28	24,10	25,37	24,74	0,90	200,00	0,24	0,09	9,00	4,18	1,51E+04	1,67E+03	3,34E+05	3,83E+06	6,58
35	24,31	23,82	24,07	0,35	200,00	0,25	0,17	9,00	4,11	1,28E+04	1,42E+03	2,84E+05	1,72E+06	6,23
49	23,10	25,10	24,10	1,41	200,00	0,24	0,18	9,00	4,52	3,28E+04	3,65E+03	7,29E+05	4,09E+06	6,61

Anexo B. Análisis Estadista ANOVA

Análisis de Varianza de las muestras de Gallinaza de los diferentes tratamientos para análisis de ABGs.

Completely Randomized AOV for E, coli

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	0.08687	0.02896	8.58	0.0070
Error	8	0.02700	0.00338		
Total	11	0.11387			

Completely Randomized AOV for Coliformes

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	1.65296	0.55099	56.61	0.0000
Error	8	0.07787	0.00973		
Total	11	1.73083			

Completely Randomized AOV for SOMCPH (bacteriofagos)

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	13.0882	4.36272	2941.16	0.0000
Error	8	0.0119	0.00148		
Total	11	13.1000			

Análisis de Varianza de las muestras de Gallinaza de los diferentes tratamientos para análisis de ARGs.

Completely Randomized AOV for blaTEM

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	4.89529	1.63176	98.89	0.0000
Error	8	0.13200	0.01650		
Total	11	5.02729			

Completely Randomized AOV for sull

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	2.74820	0.91607	25.78	0.0002
Error	8	0.28427	0.03553		
Total	11	3.03247			

Completely Randomized AOV for qnrS

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	2.20103	0.73368	38.35	0.0000
Error	8	0.15307	0.01913		
Total	11	2.35409			

Completely Randomized AOV for tetW

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	3.36302	1.12101	95.34	0.0000
Error	8	0.09407	0.01176		
Total	11	3.45709			

Completely Randomized AOV for 16s rDNA

Source	DF	SS	MS	F	P
tratam	3	5.89697	1.96566	8.62	0.0069
Error	8	1.82360	0.22795		
Total	11	7.72057			

Prueba de Tukey

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of E. coli

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	5.2900	A
1	5.1467	A
2	5.0367	B
3	5.0533	B

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of Coliformes

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	5.9233	A
1	5.4867	B
3	5.0333	C
2	5.0267	C

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of SOMCPH (bacteriofagos)

tratam	Mean	Homogeneous Groups
1	5.1367	A
4	5.0467	A
3	3.1533	B
2	2.8733	C

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of blaTEM

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	3.1567	A
3	1.7700	B
1	1.6633	B
2	1.6267	B

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of sull

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	1.1967	A
3	0.8267	AB
2	0.4467	BC
1	-0.0967	C

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of qnrS

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	2.2100	A
3	1.9300	A
1	1.3467	B
2	1.1500	B

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of tetW

tratam	Mean	Homogeneous Groups
4	2.2700	A
3	1.5600	B
2	1.5400	B
1	0.7733	C

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of rDNA

tratam	Mean	Homogeneous Groups
1	3.8600	A
3	2.4433	AB
2	2.3867	AB
4	2.0233	B