

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Posgrados**

**Prevalencia de genes de resistencia a los antimicrobianos en el ADN de bacteriófagos aislados de plantas de tratamiento de agua residual en Quito-Ecuador**

**Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación**

**Bryan Omar Guachi Álvarez**

**Daniel Garzón, Ph. D.**

**Gabriel Trueba, Ph. D.**

**Directores de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de Magister en Microbiología

Quito, 15 de mayo del 2024

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE POSGRADOS**

**HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Prevalencia de genes de resistencia a los antimicrobianos en el ADN de bacteriófagos aislados de plantas de tratamiento de agua residual en Quito-Ecuador**

**Bryan Omar Guachi Álvarez**

Nombre del Director del Programa: Patricio Rojas Silva  
Título académico: M.D., Ph. D.  
Director del programa de: Maestría en Microbiología

Nombre del Decano del colegio Académico: Carlos Valle  
Título académico: Ph. D.  
Decano del Colegio: COCIBA

Nombre del Decano del Colegio de Posgrados: Hugo Burgos  
Título académico: Ph. D.

Quito, 15 de mayo del 2024

## © DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Bryan Omar Guachi Álvarez

Código de estudiante: 00326723

C.I.: 1723740005

Lugar y fecha: Quito, 15 de mayo de 2024

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## DEDICATORIA

A mi mamita Nélica

A mi papi Julio

A mi hermanito Darwin

A mis dos ángeles que partieron de este mundo papito Pacho y abuelita Carmelina

A mi amada Villacís Fernanda y su Familia

A mi comandante Luis Álvarez

A mi abuelita Rosa

A mis tías queridas Martha e Inés

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad San Francisco de Quito por permitirme descubrirme a través de la libertad y en caminar mi rumbo profesional.

Al Instituto de Microbiología (IM-USFQ): Ph. D. Gabriel Trueba y todo su personal quienes permitieron el desarrollo técnico operativo del presente trabajo.

A Darío F. Cueva cuya contribución fue de vital importancia en la estandarización de protocolos, y a José Álvarez por brindarme los reactivos necesarios.

Al Institute de Virología “Dr. J. M. Vanella” (UNC-Argentina): Guadalupe Di Cola, Anabella Fantilli, Gisella Masachessi, Silvia Nates, María Belén Pisano, Viviana Re. Un equipo multidisciplinario que compartieron su metodología para concentrar virus entéricos.

Al Colegio de Ciencias de la Salud (COCSA-USFQ): Daniel Garzón, tutor que con mucha paciencia guió mi trabajo. Álvaro Pérez, Susana Hernández, David Pacha, con quienes concentramos las aguas residuales, y desarrollo de experimentos de detección, así como la escritura de este trabajo.

Al personal Técnico Operativo Empresa Pública Metropolitana de Agua Potable y Saneamiento de Quito (EPMAPS-Quito): Ing. Freddy Muñoz Msc., Tec. Freddy Sarabia, Ing. Juan Miguel Guadamud, Ing. Jaime Cahuasqui, quiénes fueron parte fundamental del muestreo de las plantas de tratamiento.

Al Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI (Sede Quito): Ing. Nathaly Argüello Msc., Carolina Satán Msc., quienes permitieron la extracción de ADN y facilitaron los controles bacterianos.

A mis amigos de la Maestría, especialmente a Kath, Liz, Dianita quienes incondicionalmente me apoyaron para finalizar con este trabajo.



## RESUMEN

La continua evolución y propagación de clones resistentes a los antibióticos puede ser concebida a partir de la interconexión de los hábitats: humanos, animales y ambientales. Dentro de los diversos factores que incrementan la probabilidad del fenómeno de transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés *Horizontal Gene Transfer*), destacan los bacteriófagos como reservorios ambientales de genes de resistencia a los antibióticos (ARG's, del inglés *Antibiotic Resistance Genes*) e integrones. Los integrones de clase 1 (*intl1*) son plataformas génicas, permiten la: recombinación, adición y expresión de ARG's. El presente trabajo captura una instantánea sobre el estado de ARG's e *intl1* integrados en el ADN de bacteriófagos concentrados (100x), provenientes de afluentes de 27 plantas de tratamiento de agua residual (WWTP's del inglés *Waste Water Treatment Plants*) del Cantón Quito (n=81). Los genes identificados por PCR convencional arrojaron las siguientes prevalencias: *intl1* (74.1%), *sul-1* (70.4%), *sul-2* (61.7%), *tet-C* (37%), *aph(3')-IIIa* (24,7), *tet-A* (18.5%), *tet-B* (7.4%), *bla<sub>CTX-M</sub>* (4.9%) y *sul-3* (3.7%). En cuanto a la positividad de *intl1* y ARG's, se halla una correlación estadísticamente significativa ( $r=0.70$ ;  $p<0.001$ ). Los hallazgos no solo indican a los fagos como reservorios ambientales de genes de resistencia si no también, destaca su probable participación en la movilización de los genes descritos, esto incidiría en la dinámica evolutiva de las poblaciones bacterianas.

Palabras clave: Bacteriofagos, ARG's, integrón, ADN, HGT, WWTP's



## ABSTRACT

The continuous evolution and spread of antibiotic-resistant clones can be conceived from the interconnection of human, animal, and environmental habitats. Among the various factors that increase the probability of the phenomenon of horizontal gene transfer (HGT), bacteriophages stand out as environmental reservoirs of antibiotic resistance genes (ARGs). Class 1 integrons (*intI1*) are gene platforms that allow: recombination, addition, and expression of mobile segments of DNA where ARG's typically occur. This work captures a snapshot of the state of ARG's and their relationship with *intI1* integrated into the DNA of environmental phages (100X concentrated with PEG-NaCl), coming from influent of 27 wastewater treatment plants (WWTP's) of Quito across three months (n=81). The genes identified by PCR showed the following prevalence: *intI1* (74.1%), *sul-1* (70.4%), *sul-2* (61.7%), *tet-C* (37%), *aph(3')-IIIa* (24,7), *tet-A* (18.5%), *tet-B* (7.4%), *bla<sub>CTX-M</sub>* (4.9%) and *sul-3* (3.7%). The *intI1* presence was significantly correlated with the presence of ARG's (r=0.8). The findings not only indicate phages as environmental reservoirs of resistance genes but also pinpoint a likelihood in the mobilization of the ARG genes affecting the evolutionary dynamics of bacterial populations.

Keywords: Bacteriophage, ARG's, integron, DNA, HGT, WWTP's

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO .....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
Cepas de referencia .....	17
Sitios de muestreo y preparación de muestras.....	17
Concentración de aguas residuales (100X) .....	18
Purificación de fracción fágica .....	18
Eliminación de ADN extraviral.....	19
Extracción de ADN.....	20
Detección molecular de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), los genes 16s rRNA y intl1 .....	20
Análisis estadístico y geográfico espacial .....	21
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
Purificación de fracción fágica .....	22
Detección molecular de genes de (ARG's, 16s rRNA e intl1 en el ADN de la fracción fágica.....	22
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
intl1 .....	25
sul-1, sul-2, tet-C .....	26
blaCTX-M, mec-A.....	26
aph (3')-IIIa, tet-A, tet-B, sul-3 .....	27
fos-A,C,L; aacA-aphD; erm-A,C; mrc-1,2,3,4,5 .....	27
Importancia en las plantas de tratamiento de aguas (WWTP).....	28
Fagos .....	28
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>Anexo A: Coordenadas de wwtp's .....</b>	<b>49</b>
<b>Anexo B: Condiciones de PCR ARG's, 16s, intl1 .....</b>	<b>50</b>
<b>Anexo C: Estandarización de PCR'S ARG'S E INTL1 .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Primers utilizados en este estudio.....	39
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.:Ubicación de los puntos de muestreo.....	40
Figura 2: Controles pre-extracción de ADN. ....	41
Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa de resistencias a la sulfonamidas .....	42
Figura 4: Identificación trimestral de genes de resistencia en afluentes de 27 WWTP's ...	43
Figura 5: Prevalencia de ARG's objetivo en los afluentes de los WWTP's.....	44
Figura 6: Sumatoria de positividad por cada WWTP y por cada mes.....	45
Figura 7: Positividad mensual de ARG's por mes.....	46

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (AMR del inglés *Antimicrobial Resistance*) es reconocida como uno de los mayores retos de salud global en el siglo 21 (Hernando-Amado et al., 2019). La interconexión de ecosistemas y microbiomas de: granjas, hospitales, plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTP's del inglés *Wastewater Treatment Plants*) y entornos naturales, fomenta la aparición, adquisición y propagación de las resistencias a través de los denominados genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG's del inglés *Antibiotic Resistance Genes*)(Martínez, 2012). Su diseminación y adquisición global por parte de bacterias de importancia clínica, es analizada desde un enfoque *One Health* a uno *Global Health* (Berendonk et al., 2015). “*One Health*” se refiere a un contexto local, donde se aborda la AMR a nivel de ciudad o regional; a diferencia del enfoque “*Global Health*”, que se centra en las condiciones globales que facilitan la propagación de la AMR e involucra acciones políticas transnacionales (Koplan et al., 2009; Wernli et al., 2017).

Pero cómo surge la resistencia a los antimicrobianos (AMR). Para entenderlo, es primordial conocer que los genes que constituyen el resistoma de un microorganismo, están asociados netamente a la filogenia de las poblaciones microbianas (Nesme & Simonet, 2015). Los mecanismos por los cuales las bacterias pueden cambiar su fenotipo “sensible” a “resistente”, están dados por (Brown-Jaque et al., 2015): mutaciones, recombinación de ADN extraño o la adquisición de genes de resistencia. La AMR surge producto de la interacción continua de los microorganismos que colonizan diferentes huéspedes (humanos, animales, vegetales) en diferentes niveles (Pehrsson et al., 2016): i) la propagación urbana, ii) la destrucción del hábitat, iii) el consumo antropogénico de una variedad limitada de animales, vegetales, etc. Lo

mencionado conlleva a una caída de la diversidad genética y eminentemente a la homogenización de host microbianos, al ser similares pueden difundir entre sí sus genes, con algunas restricciones (Martínez, 2012). Por lo cual está ampliamente aceptado que los ARG de bacterias patógenas se encuentran comúnmente en diferentes poblaciones bacterianas ambientales y que probablemente fueron adquiridos a través de transferencia horizontal de genes (HGT del inglés *Horizontal Gene Transfer*) (Peterson & Kaur, 2018).

La HGT, constituye los mecanismos que permiten el intercambio genético entre linajes (distantes o cercanos) (Zhaxybayeva et al., 2006; Zhaxybayeva & Doolittle, 2011). Los elementos de este mecanismo contribuyen a: la expresión, plasticidad, evolución y movilidad genética. Destacan los *mobile genetic elements* (MGE's), segmentos de ADN que codifican proteínas, enzimas y otros productos que median el movimiento de ADN entre genomas (intracelulares), destacando (Frost et al., 2005): transposones, secuencias de ADN con la capacidad de flanquear genes, escindirlos e insertarlos; plásmidos que son módulos genéticos circulares que coexisten independientes del cromosoma, transportan genes (ARG, factores de virulencia, etc.) y con origen de replicación propio. Los movimientos intercelulares “clásicos” en procariontes pueden clasificarse en: transformación natural que refiere a la incorporación de ADN exógeno al cromosoma bacteriano; en la transducción ciertos genes son movilizados por virus bacterianos (bacteriofagos o fagos); por último, en la conjugación ciertas bacterias transportan directamente ADN a otras bacterias “emparentadas” (Burmeister, 2015; Sun, 2018).

Los bacteriófagos son considerados las partículas más abundantes en el planeta ( $10^{31}$ ) (Comeau et al., 2008), infectan exclusivamente bacterias, la mayoría poseen una cápside de proteínas que protege su genoma (ADN o ARN, de cadena simple o doble, 3.4kb -500 kb); su

arquitectura fagómica es usualmente mosaica lo cual refleja un inusual elevado nivel de intercambio genético y probablemente representen el mayor sumidero de genes inexplorados en la biósfera (Hatfull, 2008; Keen, 2015). La genómica comparativa ha permitido dilucidar coevolución entre los cromosomas bacterianos y sus fagos (profagos o sus restos integrados), se identifican algunos casos en los que los fagos inscritos codifican factores de virulencia bacterianos (toxinas, superantígenos, proteínas de unión, lisinas) (Boyd, 2012), necesarios para causar enfermedad (*Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes*, entre otros); se estima que alrededor del 20% del total de los genomas bacterianos fueron adquiridos por bacteriófagos o similares (Brüssow et al., 2004). Su diversidad puede ser agrupada dependiendo del ciclo replicativo. En el ciclo lítico los fagos “líticos” secuestran la maquinaria replicativa de su host y causan lisis bacteriana, generando una nueva progenie de viriones; a diferencia de los fagos “temperados” que generalmente se integran al cromosoma bacteriano, pero también podrían tomar la ruta lítica (Salmond & Fineran, 2015); hay que aclarar que en algunos casos la inserción de profagos puede ser perjudicial para el host por la inactivación de genes funcionales (Bernhardt et al., 2000).

La transducción se refiere a la transferencia de ADN extraño, es mediada por bacteriófagos; se puede dividir en transducción especializada, cuando hay una transferencia limitada de genes y que son, generalmente cercanos al sitio de escisión aberrante en el cromosoma del host (Chiang et al., 2019). A diferencia de la transducción generalizada, donde se encapsulan y movilizan segmentos aleatorios de ADN bacteriano huésped (cromosomal o plasmídico) (Beumer & Robinson, 2005). Otro de los mecanismos de intercambio de ADN está liderado por agentes de transferencia genética (GTA del inglés Gene Transfer Agents), partículas similares a fagos, que son profagos remanentes del huésped bacteriano pero carecen de las características que definen

a los bacteriófagos, y a pesar de que las tasas de transferencia mediada por GTA's son superiores a la transformación y transducción, sus mecanismos aún no han sido dilucidados por completo (Lang et al., 2012; McDaniel et al., 2010).

Los bacteriófagos de afluentes WWTP's al ser parte de las poblaciones microbianas intestinales de humanos y animales podrían ayudar a entender la diseminación de genes de resistencia a los antibióticos, que circulan en un punto geográfico determinado (Colomer-Lluch, Imamovic, et al., 2011; Muniesa et al., 2004). El presente estudio empleó afluentes de 27 WWTP's municipal en el cantón Quito (provincia de Pichincha), con la finalidad de identificar 15 ARG's de importancia clínica y el gen de integrón- integrasa de clase 1 (*intl1*) en el ADN de la fracción fágica y entender, de existir, sus patrones de diseminación en un trimestre. Tomando en cuenta los indicadores y la clasificación de los antibióticos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evaluar el patrón de prescripción de antibióticos o que recurrentemente se utilizan para las infecciones (MUGADA et al., 2021), fueron estudiados los siguientes genes que confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*blaCTX-M*), tetraciclina (*tet-A,B,C*), fosfomicina (*fos-A,C,L*), sulfonamida (*sul-1,2,3*), oxacilina (*mec-A*), gentamicina (*aacA-aphD*), eritromicina (*erm-A,C*), aminoglucósido (*aph(3')-IIIa*), colisitina (*mrc-1,2,3,4,5*).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Cepas de referencia*

Como controles positivos se utilizó bacterias donadas por el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito (IM-USFQ) y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública – INSPI (Sede Quito), para los genes: *blaCTX-M* (*E. coli*), *mrc-1* (*E. coli*), *tet-A* (*E. coli*), *tet-B* (*S. enterica* serovar Typhimurium), *tet-C* (*S. enterica* serovar Typhimurium), *fos-A* (*E. coli*), *sul-1,2,3* (*E. coli*), *mec-A* (*S. aureus*), *aacA-aphD* (*S. aureus*), *erm-A,C* (*E. coli*), *aph(3')-IIIa* (*S. aureus*).

### *Sitios de muestreo y preparación de muestras*

Se recolectó agua residual de los afluentes de 27 WWTP's del cantón Quito (Pichincha Ecuador) como lo grafica la Figura 1 (para consultar coordenadas consultar Tabla suplementaria 1), se realizó un muestreo puntual. Tomando en cuenta la variación estacional de la precipitación mensual de Pichincha (1200 mm), se seleccionó los meses de: junio, julio y agosto que corresponden a época de estiaje (periodo con la menor precipitación mensual)(Reinoso, 2015). En el punto de muestreo, el operador recolectó 750-800 ml de agua residual del afluente (a 25 cm de profundidad), en recipientes de vidrio (1000 ml), previamente autoclavados (1 atm., 121 ° C; 15 min; HCL 10%), las muestras se transportaron a 4° C, hasta la llegada al Laboratorio de Microbiología del Colegio de Ciencias de la Salud de la Universidad San Francisco de Quito (COCSA-USFQ)(Borja-Serrano et al., 2020)

### *Concentración de aguas residuales (100X)*

Para la concentración de aguas residuales 100X se siguió la metodología de (Martínez Wassaf et al., 2014), con algunas modificaciones. A partir de cada muestra se alicuotó 100 ml de agua, se centrifugó (4000 rpm, 20 min, 4° C), el sobrenadante (S1) se almacenó, el pellet se pesó (peso Falcon + pellet – peso Falcon) y se agregó 3 veces de solución de extracto de carne al 3% en NaNO<sub>3</sub> 2M (pH 5.5) respecto al peso del pellet, para dar una proporción 3:1. Se incubó en agitación (4°C, 1h, 180 rpm); luego se centrifugó (8300 rpm, 20 min, 4° C) y se obtuvo el S2. Tanto el S1 como el S2 se homogenizaron y se ajustó el pH a 6,5-7,2; a S1+S2 se agregó PEG 6000 al 10% (w/v) y NaCl 2% (w/v), y se dejó en agitación (120 rpm, 24h, 4°C).

Al día siguiente, se centrifugó (8300 rpm, 25 min, 4° C) y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 1 ml de PBS (pH 7.4) y se modificó el pH a 8.0 mediante el agregado de NaOH 0.1N, se incubó en agitación (4°C, 1h, 60 rpm). Posteriormente, se centrifugó (8300 rpm, 20 min, 4° C), el sobrenadante resultante es la muestra concentrada 100X. La muestra se identificó con una numeración y el nombre de la WWTP, para finalmente almacenar: 250  $\mu$ l a -80° C y 750  $\mu$ l a 4° C.

### *Purificación de fracción fágica*

Tras concentrar 100X mensualmente las muestras, se procedió con la respectiva purificación de fagos, con la que se elimina bacterias, vesículas, ADN y ARN, como lo describe (Blanco-Picazo et al., 2023; Calero-Cáceres & Muniesa, 2016), con ciertas modificaciones. Para la filtración se utilizó filtros de nitrocelulosa (0,22  $\mu$ m) *Polyether Sulfone (PES) low-protein-binding membranes* (Millex-GP Millipore, Bedford, MA). Para asegurar la ausencia de la

fracción bacteriana, se agregó cloroformo (10% v/v), se incubó en agitación (60 rpm, 5 min, temperatura ambiente), luego se centrifugó (4000 rpm, 10 min, 4° C), se colectó únicamente la fracción superior y se colocó en nuevos tubos eppendorf. Como control esta fracción se sembró en medio LB (50 µL por duplicado, extensión en placa) e incubó (24 H, 36° C) para posteriormente evaluar la presencia bacteriana residual, con el crecimiento de colonias, y únicamente las muestras que no evidenciaron crecimiento avanzaron al siguiente paso. Finalmente, se realizó un ensayo de “*spot-test*” con 2 µL del filtrado, sobre agar LB duro (2%) y suave (0.7%) con cepas ATCC de *E. coli* (25922, Top 10, J53) como huésped, para de esta manera corroborar la presencia/ausencia de bacteriófagos por la visualización de calvas.

#### *Eliminación de ADN extraviral*

En un tubo eppendorf se mezcló 450 µl de la fracción viral entera (filtrada y evaluada), 50 µl buffer de reacción 10X RQ1 (400mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgSO<sub>4</sub> y 10 mM CaCl<sub>2</sub>), 2 µl de DNAsa (1 u/µl) y 1-2 µl de solución A RNAsa (4 mg/ml). Se homogenizó e incubó (1h 30 min, a 37 °C). Después se añadió 50 µl de EDTA (0.5 M, pH 8) y se incubó (5 min, a temperatura ambiente) y luego en un termobloque ( 15 min, 70 °C). Para comprobar la degradación completa del ADN se realizó PCR del gen *16s* rRNA (Forward-primer-S-D-Bact-0341-b-S-17; Reverse-primer-S-D-Bact-0785-a-A-21) (Tabla 1; Tabla suplementaria 2). Todas las muestras fueron compiladas en refrigeración (4° C).

### *Extracción de ADN*

A partir de cada muestra se pipeteó 200 µl en el casete del “*Nucleic Acid Extraction Kit (Magnetic Bead Method)*” que opera con el equipo Bioperfectus SMPE-960. La concentración (ng/µl) y pureza del ADN de fago extraído se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Thermo-scientifics, Wilmington, USA). Las muestras se almacenaron a -20°C.

### *Detección molecular de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), los genes 16s rRNA y int1*

En primer lugar se identificó los genes *int1* y *16s rRNA*, así como los genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG's): Cefotaxime (*bla<sub>CTX-M</sub>*) (Hasibuan et al., 2018); Colistina (*mrc-1,2,3,4,5*) (Borowiak et al., 2017; Rebelo et al., 2018); Tetraciclina (*tet-A,B,C*) (Ng et al., 2001); Fosfomicina (*fos-A,C,L*) (Freire et al., 2023); Sulfonamida (*sul-1,2,3*) (Kern, 2002; Wu et al., 2010); Oxacilina (*mec-A*), Gentamicina (*aacA-aphD*), Eritromicina (*erm-A,C*) (Strommenger et al., 2003), Aminoglucósido (*aph(3')-IIIa*) (Udo & Dashti, 2000). Para la configuración de las PCR multiplex y tres singleplex, se empleó la ADN polimerasa de Invitrogen™ Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (2X) y dNTPs con un volumen final de 10 µl/reacción, las concentraciones finales de los componentes varían de acuerdo a cada PCR (revisar la Tabla Suplementaria 2). Las bandas se visualizaron con 5 µL de cada producto de PCR en electroforesis con agarosa del 1.5-2% y 100 V, dependiendo las condiciones.

### *Análisis estadístico y geográfico espacial*

El análisis de datos se realizó con R v4.3.1 (Ihaka & Gentleman, 1996). Se implementó el paquete (dplyr v1.1.3) (Wickham et al., 2023) para el cálculo de porcentajes (abundancia) de los genes en cada punto de muestreo o a lo largo de los tres meses, y los gráficos respectivos de estos datos se realizaron con ggplot2 v3.4.4 (Wickham, 2016). Los gráficos resultantes correspondieron a gráficos de barras obtenidos bajo la función `geom_bar`, y gráficos de calor o *heat-maps* con las funciones `geom_tile` y `scale_fill_gradient` del paquete (ggplot2 v3.4.4) (Wickham, 2016). Para dilucidar las posibles relaciones espaciales entre la prevalencia de genes de resistencia a los antibióticos, la densidad de población y la cobertura del suelo, se construyeron mapas utilizando ArcGIS Pro v.10.8.2 (ESRI, 2023). Para el mapa de densidad de población, los conjuntos de datos se obtuvieron del Proyecto de Intercambio de Datos Humanitarios (<https://data.humdata.org/dataset>). Estos datos se interpolaron para crear una superficie continua que representa la densidad de población en diferentes áreas. En este contexto, la densidad se cuantifica como el número de personas por 345,6 metros cuadrados. Se establecieron categorías de densidad donde una densidad alta se indica con un valor de 19,4 y una densidad baja se representa con un valor de 1,7. En cuanto al mapa de cobertura del suelo, diferencia visualmente los diversos tipos de ecosistemas que se encuentran en el área de estudio, según las clasificaciones proporcionadas por el estudio de (Ron, 2020).

## RESULTADOS

### *Purificación de fracción fágica*

Tras la concentración (100X) de 27 muestras mensuales, correspondientes los meses de junio, julio y agosto, se obtuvo un total de n=81 concentrados (1 ml c/u), que fueron rotulados por un código numérico (1-27), previo a su inmediato almacenamiento a 4 °C, todas las muestras pasaron los controles correspondientes a la ausencia bacteriana, ácidos nucleicos y mantenían la capacidad de causar lisis (calvas) a al menos a una de las 3 *E. coli* ATCC (25922, Top 10, J53) expuestas (Figura 2).

### *Detección molecular de genes de (ARG's, 16s rRNA e int11 en el ADN de la fracción fágica*

Se estandarizó la PCR convencional de los genes objetivo (16s rRNA, *int11*, y 15 ARG's, (Figura suplementaria 1) conforme a las condiciones de la Tabla 1. Para cada una de las 81 muestras se corrió 17 reacciones de PCR's distintas y su visualización en gel de agarosa 1,5-2%. Las bandas resultantes se compararon en tamaño con el control positivo y el Ladder (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™) (Figura 3).

En este estudio 8 de los 15 ARG's objetivo fueron identificados en el ADN de la fracción fágica de los afluentes de las 27 WWTP durante los 3 meses (Figura 4). Se identificó una alta prevalencia del gen *int11* encontrándose en 74.1% de las muestras testeadas, la presencia del gen *int11* durante los 3 meses de muestro guarda una correlación estadísticamente significativa con las WWTP que presentan mayor número de genes de resistencia identificados ( $r=0.7$

$p < 0.001$ ) ; Y, como lo grafica la Figura 5 los ARG *sul-1* (70.4%) y *sul-2* (61.7%) fueron los genes más prevalentes seguidos por los ARG *tet-C* (37%), *aph(3')-IIIa* (24.7%), *tet-A* (18.5%), *tet-B* (7.4%), *bla<sub>CTX-M</sub>* (4.9%) y el ARG *sul-3* (3.7%) fue el menos frecuente.

De acuerdo con el *heatmap* de la Figura 6a. y 6b. se puede visualizar que el número de resistencias encontradas (suma de positivos por cada mes y ARG por WWTP) varió, es decir no hay un patrón de positividad para cada WWTP. De la misma manera, la Figura 6c. permite entender que, en cada una de las 27 WWTP no se mantiene un perfil de resistencia mensual. Tras realizar el análisis multidimensional para divisar agrupamientos de ARG's por WWTP no se los identifica, por la alta variabilidad de detección de ARG's (Figura 7c).

El gen que con más frecuencia se encontró fue *sul-1*, identificándose en 18, 19 y 21 muestras de las 27 evaluadas, correspondientes a los meses de junio, julio y agosto, respectivamente. A diferencia de, *sul-3* que fue el ARG que se encontró con menor frecuencia, identificándolo únicamente en el mes de julio en 3 de las 27 WWTP's evaluadas (Figura 6c). De acuerdo con la Figura 7a. se visualiza que el mes de agosto presenta la mayor positividad de ARG's detectados, seguidos de los meses de julio y junio. Durante los tres meses de muestreo, de acuerdo con la Figura 7b, se logra entender que las WWTPs con mayor positividad son "La Delicia" y "Las Tolas", mientras que los afluentes con la menor positividad fueron las WWTP's "La Merced y Chavezpamba".

## DISCUSIÓN

Persiste la controversia sobre cómo ciertos genes de resistencia se diseminan por diversos escenarios incluyendo los entornos clínicos y los productos de consumo directo como: hortalizas y carne (pollo, pescado, mejillones) (Blanco-Picazo et al., 2023; Calero-Cáceres et al., 2019; Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2011; Shousha et al., 2015). A pesar de que la transducción ha sido descrita hace más de 70 años (1952) (Parkinson, 2016), la contribución de los bacteriófagos como intermediarios ambientales en la movilización de ARG's entre cepas resistentes y las cepas sensibles necesita ser descrita a profundidad (Calero-Cáceres et al., 2019).

Algunos autores parten de la premisa que las WWTPs son verdaderos sumideros de ARG's, esto podría explicarse por a la alta abundancia y diversidad microbiana, sumado a la alta concentración de ADN libre y la elevada prevalencia de  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y fosfato, factores que promoverían eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) (Volkman et al., 2004). De acuerdo con numerosos estudios (Blahová et al., 1993; Muniesa et al., 2004; Schmieger & Schicklmaier, 1999), los fagos movilizan no solo ARG's entre las bacterias sino, genes que codifican factores de virulencia y otros genes, mediante transducción generalizada.

En las parroquias del Noroccidente del cantón Quito (Pacto Nanegal y Gualea) se visualiza que sus WWTP's presentan la mayor positividad y diversidad de ARG's, frecuencia que se mantiene durante el trimestre evaluado. Esto se puede correlacionar con sus actividades productivas, en las que comúnmente no hay una regularización en cuanto al uso de antibióticos, como son: la piscicultura, agricultura, ganadería y avicultura (GAD-Gualea, 2023; GAD-Nanegal, 2023; GADP-Pacto, 2023).



En las WWTP's complementarias se encontraron ARG's en las fracciones fágicas de casi todos los afluentes de estos sistemas de tratamiento. Esto podría deberse a que las muestras de agua fueron tomadas en parroquias, mayoritariamente rurales, donde los pequeños productores no tienen la guía agropecuaria o veterinaria y utilizan antibióticos sin prescripción, esto se evidencia en el estudio en leche cruda comercializada en los cantones de la provincia de Pichincha por Puga-Torres y colaboradores (2024) donde se encontró que la mayoría de las muestras tenían residuos de sulfonamidas, tetraciclinas, betalactámicos y aminoglucósidos (Puga-Torres et al., 2024).

### *intl1*

Dentro de los elementos genéticos móviles (MGE's del inglés *Mobile Genetic Elements*) destaca el integrón- integrasa (*intl1*), que está correlacionado con una amplia gama de contaminantes (antibióticos, metales pesados) (Piergiacomo et al., 2020). En este estudio presentó una alta prevalencia (74.1%), lo cual guarda concordancia con el estudio de (Yang et al., 2018) quienes encontraron *intl1* en más de la mitad de sus muestras (66.7%), en un estudio muy similar en busca de ARGs en bacteriófagos en el río Funan en la provincia de Sichuan, China. Curiosamente se encontró que la positividad trimestral del gen *intl1* identificado por cada WWTP muestreada es directamente proporcional a la positividad de ARG's (trimestral) encontrados en los mismos lugares de muestreo, por ejemplo, en las WWTP's: "La Calera", "Chavezpamba", "La Merced", "Nuevos Horizontes" se encontró la menor positividad de ARG's e *intl1*. Los integrones de clase 1 frecuentemente llevan casetes de genes asociados con resistencia antibiótica de relevancia clínica (HALL et al., 1999; He et al., 2014). La alta prevalencia encontrada del *intl1* y su correlación significativa con los ARGs, posiblemente

incrementaría la probabilidad de la transferencia horizontal de estos genes de resistencia para antibióticos y su diseminación a nivel ambiental.

#### *sul-1, sul-2, tet-C*

Estos tres genes tuvieron la mayor prevalencia en nuestro estudio con valores sobre el 70%, 60% y 30% respectivamente, lo que se correlaciona con los estudios de (Colomer-Lluch et al., 2014; Yang et al., 2018), en los que analizan la prevalencia de genes de resistencia a antibióticos en la fracción de ADN, e identificaron frecuencias similares a las descritas en este estudio (*sul-1* > *sul-2* > *tet-C*). Lo mencionado puede explicarse debido a que las sulfonamidas tienen alto nivel de persistencia ambiental, por su alta solubilidad (Heise et al., 2006; Luo et al., 2011). Con respecto a *tet-C*, las tetraciclinas no son biodegradables y se pueden absorber fácilmente en los lodos de las WWTP's (Kim et al., 2005; Zhang & Zhang, 2011).

#### *bla<sub>CTX-M</sub>, mec-A*

Con respecto al gen *bla<sub>CTX-M</sub>*, en nuestro estudio encontramos que presenta una frecuencia alrededor del 5% del total de muestras, resultados que fueron similares a los estudio de (Quirós et al., 2014) donde *bla<sub>CTX-M</sub>* en la fracción de ADN fágico mantiene una de las prevalencias más bajas (4,9%). A pesar de la baja prevalencia, la identificación de *bla<sub>CTX-M</sub>* dada su importancia en entornos clínicos (Haenni et al., 2014), a nivel ambiental puede suponer una amenaza importante para la salud pública (Yang et al., 2018). En nuestro estudio no se encontró *mec-A*, en general otros estudios no lo identifican o su presencia es muy baja (Colomer-Lluch

et al., 2014; Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2011; Pires et al., 2023; Volkmann et al., 2004). Esto puede deberse a que en general las bacterias del género *Staphylococcus* que conlleven la resistencia a la meticilina no se encuentran con gran frecuencia en el tracto intestinal (Quirós et al., 2014).

#### *aph (3')-IIIa, tet-A, tet-B, sul-3*

En nuestro estudio identificamos con la siguiente frecuencia a los genes *aph (3')-IIIa* (24.7%) > *tet-A* (18.5%) > *tet-B* (7,4%) > *sul-3* (3,7%). Resultados similares con el estudio de (Yang et al., 2018), quienes encontraron una prevalencia del 16.7% para el gen *aph (3')-IIIa*, que codifica el aminoglucósido fosfotransferasa y confiere resistencia a los aminoglucósidos (Shokravi et al., 2015). Los resultados del estudio de (Shin et al., 2022), son comparables, quienes al trabajar en la fracción bacteriana de afluentes de WWTP, identificaron un patrón similar de genes de resistencia en el ambiente conformado por genes de resistencia para aminoglucósidos (*aadA1*, *aph (3')-IIIa*, *aac (6')* y *strA*), β-lactámicos (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>* y *bla<sub>IMP</sub>*), glycopeptidos (*vanC*, *vanD*), sulfonamidas (*sul-1* y *sul-3*) y tetraciclina (*tet-B*, *tet-C*, *tet-M*).

#### *fos-A,C,L; aacA-aphD; erm-A,C; mrc-1,2,3,4,5*

Tomando en cuenta que los ARG's *fos-A,C,L; aacA-aphD; erm-A,C; mrc-1,2,3,4,5* no fueron detectados en ninguna WWTP durante los 3 meses evaluados. Una probable densidad bacteriana baja con estos ARG's en su genoma podría explicar su ausencia en bacteriófagos. Y, tomando en consideración que autores como (Colomer-Lluch et al., 2014; Colomer-Lluch,

Imamovic, et al., 2011; Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2011) han manifestado que la densidad de estos ARG's en bacteriófagos es normalmente menor a la encontrada en el ADN bacteriano.

#### *Importancia en las plantas de tratamiento de aguas (WWTP)*

En un contexto general se evidencia que los perfiles de resistencia de cada WWTP son altamente dinámicos, en prevalencia y frecuencia, adentro de cada WWTP y entre los meses evaluados (Figura 6). Estas marcadas diferencias según (Pires et al., 2023) pueden asociarse al: i) uso diferencial de antibióticos (veterinario, comunidad y hospitales), ii) variedad de insumos ambientales en las cuencas de captación de WWTP, iii) incremento y variabilidad del consumo ponderado de la población de antibióticos (con objetivos veterinarios y humanos).

#### *Fagos*

Ya se ha demostrado, en el ecosistema intestinal de los mamíferos, que el tratamiento con antibióticos conduce al enriquecimiento de fagomas con ARG's que confieren resistencia al medicamento administrado (Modi et al., 2013). Este estudio aporta evidencia a la presencia ARG's en el ADN de bacteriófagos de aguas residuales. La posibilidad de que estos bacteriófagos sean mediadores ambientales o que cumplan funciones similares a “reservorios” de genes de resistencia bacteriana contra antibióticos, representa un riesgo latente debido a su abundancia; persistencia en cuerpos de agua (Calero-Cáceres & Muniesa, 2016) y estabilidad ambiental (Duran et al., 2003). Autores como (UBUKATA et al., 1975) resaltan que la transducción generalizada es poco frecuente (entre  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$  transductantes/Unidades

Formadoras de placas), pero debido a que los bacteriófagos son las entidades más abundantes ( $\sim 10^{30}$  fagos y  $\sim 10^{25}$  infecciones) (Dion et al., 2020; Watson et al., 2018), no se puede ignorar su contribución a la difusión de ARG's y otros genes (Liu et al., 2020; Taylor et al., 2019; Torres-Barceló, 2018). Este trabajo podría aportar a la idea de que estas partículas podrían ayudar al mantenimiento de la epidemiología dinámica de ARG's que inicialmente tuvieron una localización cromosómica, por ejemplo en especies de *Kluyvera* spp. y ahora junto con otros elementos de la HGT se ha movilizó a clones multirresistentes pandémicos (D'Andrea et al., 2013; Hawkey & Jones, 2009).

Nuestros resultados se limitan al entorno viral, no sabemos si los ARG's detectados pueden conferir resistencia al anfitrión bacteriano específico, al desconocer el entorno genético alrededor del ARG (Colomer-Lluch, Jofre, et al., 2011), quienes también resaltan la complejidad de replicar a nivel de laboratorio el fenómeno de la transducción que desencadene en la resistencia bacteriana, algunos aspectos que complican este objetivo son: i) la identificación de cepa receptora y bacteriófago donador; ii) dificultad de recreación de condiciones físico-químicas y biológicas idóneas. Varios equipos lo han logrado, es el caso de (Pfeifer et al., 2022) quienes dilucidaron que los fago-plásmidos son capaces de difundir ciertos genes de resistencia (cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y colistina) a través de la infección y la conversión lisogénica.

En esta misma línea el uso de cloroformo puede haber impactado en la proporción de ciertos grupos de fagos. De acuerdo con (Bisen et al., 2024), el uso del cloroformo podría introducir un sesgo al resultar en la pérdida de abundancia de ciertos grupos de fagos (por ejemplo fagos sin cola y miembros de la familia Tectiviridae), debido a su sensibilidad.

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que los bacteriófagos libres, colectados a partir de afluentes de 27 WWTP's del cantón Quito (Pichincha-Ecuador), codifican en su ADN genes de resistencia a los antimicrobianos (ARG's), con la siguiente frecuencia: *sul-1* > *sul-2* > *tet-C* > *aph(3')-IIIa* > *tet-A* > *tet-B* > *blaCTX-M* > *sul-3*.

Los bacteriófagos dependiendo del sitio geográfico estudiado contienen cantidades variables de ARG's, de acuerdo al nivel de diseminación.

Debido a su abundancia y persistencia ambiental, los bacteriófagos incrementarían la probabilidad de propagación de estas y otras nuevas resistencias a los antibióticos. Su dinámica debe ser tomada en cuenta en el desarrollo de medidas de contención para la resistencia bacteriana a los antibióticos

## RECOMENDACIONES

Se recomienda emplear aquellas muestras con altas tasas de positividad, para a futuro aislar, purificar y secuenciar bacteriófagos, con la finalidad de entender su arquitectura genética y evaluar la probabilidad de transducción. Esto podría ser utilizado para relacionarlo con la implementación de medidas preventivas epidemiológicas que tomen en cuenta los bacteriófagos, y focalizarlas en la detección, análisis, prevención de exposición a estos reservorios de resistencia antimicrobianos.

## REFERENCIAS

- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M.-N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Bernhardt, T. G., Roof, W. D., & Young, R. (2000). Genetic evidence that the bacteriophage  $\phi$ X174 lysis protein inhibits cell wall synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(8), 4297–4302. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4297>
- Beumer, A., & Robinson, J. B. (2005). A broad-host-range, generalized transducing phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8301–8304. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8301-8304.2005>
- Bisen, M., Kharga, K., Mehta, S., Jabi, N., & Kumar, L. (2024). Bacteriophages in nature: recent advances in research tools and diverse environmental and biotechnological applications. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32535-3>
- Blahová, J., Hupková, M., Babálová, M., Krcméry, V., & Schäfer, V. (1993). Transduction of resistance to Imipenem, Aztreonam and Ceftazidime in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* by wild-type phages. *Acta Virologica*, *37*(6), 429–436.
- Blanco-Picazo, P., Morales-Cortes, S., Ramos-Barbero, M. D., García-Aljaro, C., Rodríguez-Rubio, L., & Muniesa, M. (2023). Dominance of phage particles carrying antibiotic resistance genes in the viromes of retail food sources. *The ISME Journal*, *17*(2), 195–203. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01338-0>
- Borja-Serrano, P., Ochoa-Herrera, V., Maurice, L., Morales, G., Quilumbaqui, C., Tejera, E., & Machado, A. (2020). Determination of the Microbial and Chemical Loads in Rivers from the Quito Capital Province of Ecuador (Pichincha)—A Preliminary Analysis of Microbial and Chemical Quality of the Main Rivers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(14), 5048. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145048>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Boyd, E. F. (2012). *Bacteriophage-Encoded Bacterial Virulence Factors and Phage–Pathogenicity Island Interactions* (pp. 91–118). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394621-8.00014-5>



- Brown-Jaque, M., Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2015). Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, *79*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.01.001>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>
- Burmeister, A. R. (2015). Horizontal Gene Transfer: Figure 1. *Evolution, Medicine, and Public Health*, *2015*(1), 193–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>
- Calero-Cáceres, W., & Muniesa, M. (2016). Persistence of naturally occurring antibiotic resistance genes in the bacteria and bacteriophage fractions of wastewater. *Water Research*, *95*, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.006>
- Calero-Cáceres, W., Ye, M., & Balcázar, J. L. (2019). Bacteriophages as Environmental Reservoirs of Antibiotic Resistance. *Trends in Microbiology*, *27*(7), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.008>
- Chiang, Y. N., Penadés, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathogens*, *15*(8), e1007878. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007878>
- Colomer-Lluch, M., Calero-Cáceres, W., Jebri, S., Hmaied, F., Muniesa, M., & Jofre, J. (2014). Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. *Environment International*, *73*, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.07.003>
- Colomer-Lluch, M., Imamovic, L., Jofre, J., & Muniesa, M. (2011). Bacteriophages Carrying Antibiotic Resistance Genes in Fecal Waste from Cattle, Pigs, and Poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(10), 4908–4911. <https://doi.org/10.1128/AAC.00535-11>
- 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>
- Comeau, A. M., Hatfull, G. F., Krisch, H. M., Lindell, D., Mann, N. H., & Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in Microbiology*, *159*(5), 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.05.001>
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, *303*(6–7), 305–317. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>

- Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
- Duran, A. E., Muniesa, M., Moce-Llivina, L., Campos, C., Jofre, J., & Lucena, F. (2003). Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.t01-1-01948.x>
- Freire, S., Grilo, T., Nordmann, P., Poirel, L., & Aires-de-Sousa, M. (2023). Multiplex PCR for detection of acquired plasmid-borne fosfomycin resistance fos genes in *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *105*(2), 115864. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115864>
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(9), 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- GAD-Gualea. (2023, January 1). *Gobierno Autónomo Descentralizado Gualea*. <Http://Www.Gadgualea.Gob.Ec/Index.Php/Ct-Menu-Item-18/Salud>.
- GAD-Nanegal. (2023, January 1). *Gobierno Autónomo Descentralizado Nanegal*. <Https://Www.Gadnanegal.Gob.Ec/Index.Php/Ct-Menu-Item-11/Ct-Menu-Item-19>.
- GADP-Pacto. (2023, January 1). *Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural Pacto*. <Https://Pacto.Gob.Ec/Produccion-Importante/>.
- Haenni, M., Saras, E., Métayer, V., Médaille, C., & Madec, J.-Y. (2014). High prevalence of blaCTX-M-1/IncI1/ST3 and blaCMY-2/IncI1/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(9), 5358–5362. <https://doi.org/10.1128/AAC.02545-14>
- HALL, R. M., COLLIS, C. M., KIM, M., PARTRIDGE, S. R., RECCHIA, G. D., & STOKES, H. W. (1999). Mobile Gene Cassettes and Integrons in Evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *870*(1), 68–80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
- Hasibuan, M., Suryanto, D., & Kusumawati, R. L. (2018). Phenotypic and molecular detection of <sup>BLA</sup> CTX-M gene extended-spectrum beta-lactamases in *escherichia coli* and *klebsiella pneumoniae* of north sumatera isolates. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *130*, 012032. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/130/1/012032>
- Hatfull, G. F. (2008). Bacteriophage genomics. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(5), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>
- Hawkey, P. M., & Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(Supplement 1), i3–i10. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp256>

- He, L.-Y., Liu, Y.-S., Su, H.-C., Zhao, J.-L., Liu, S.-S., Chen, J., Liu, W.-R., & Ying, G.-G. (2014). Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Representative Broiler Feedlots Environments: Identification of Indicator ARGs and Correlations with Environmental Variables. *Environmental Science & Technology*, *48*(22), 13120–13129. <https://doi.org/10.1021/es5041267>
- Heise, J., Hölte, S., Schrader, S., & Kreuzig, R. (2006). Chemical and biological characterization of non-extractable sulfonamide residues in soil. *Chemosphere*, *65*(11), 2352–2357. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.084>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, *4*(9), 1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, *5*(3), 299–314. <https://doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713>
- Keen, E. C. (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays*, *37*(1), 6–9. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
- Kern, M. B. (2002). Susceptibility of Danish Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(4), 513–516. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf164>
- Kim, S., Eichhorn, P., Jensen, J. N., Weber, A. S., & Aga, D. S. (2005). Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. *Environmental Science & Technology*, *39*(15), 5816–5823. <https://doi.org/10.1021/es050006u>
- Koplan, J. P., Bond, T. C., Merson, M. H., Reddy, K. S., Rodriguez, M. H., Sewankambo, N. K., & Wasserheit, J. N. (2009). Towards a common definition of global health. *The Lancet*, *373*(9679), 1993–1995. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60332-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60332-9)
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., & Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(7), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2802>
- Liu, J., Liu, P., Feng, F., Zhang, J., Li, F., Wang, M., & Sun, Y. (2020). Evaluation of Potential ARG Packaging by Two Environmental T7-Like Phage during Phage-Host Interaction. *Viruses*, *12*(10), 1060. <https://doi.org/10.3390/v12101060>
- Luo, Y., Xu, L., Rysz, M., Wang, Y., Zhang, H., & Alvarez, P. J. J. (2011). Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environmental Science & Technology*, *45*(5), 1827–1833. <https://doi.org/10.1021/es104009s>

- Martínez, J. L. (2012). Bottlenecks in the Transferability of Antibiotic Resistance from Natural Ecosystems to Human Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00265>
- Martínez Wassaf, M. G., Pisano, M. B., Barril, P. A., Elbarcha, O. C., Pinto, M. A., Mendes de Oliveira, J., DiGiusto, P., Nates, S. V., & Ré, V. E. (2014). First detection of hepatitis E virus in Central Argentina: Environmental and serological survey. *Journal of Clinical Virology*, 61(3), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.016>
- McDaniel, L. D., Young, E., Delaney, J., Ruhnau, F., Ritchie, K. B., & Paul, J. H. (2010). High Frequency of Horizontal Gene Transfer in the Oceans. *Science*, 330(6000), 50–50. <https://doi.org/10.1126/science.1192243>
- Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S., & Collins, J. J. (2013). Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*, 499(7457), 219–222. <https://doi.org/10.1038/nature12212>
- MUGADA, V., MAHATO, V., ANDHAVARAM, D., & VAJHALA, S. M. (2021). Evaluation of Prescribing Patterns of Antibiotics Using Selected Indicators for Antimicrobial Use in Hospitals and the Access, Watch, Reserve (AWaRe) Classification by the World Health Organization. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3), 282–288. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.11456>
- Muniesa, M., García, A., Miró, E., Mirelis, B., Prats, G., Jofre, J., & Navarro, F. (2004). Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6), 1134–1137. <https://doi.org/10.3201/eid1006.030472>
- Nesme, J., & Simonet, P. (2015). The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. *Environmental Microbiology*, 17(4), 913–930. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12631>
- Ng, L.-K., Martin, I., Alfa, M., & Mulvey, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15(4), 209–215. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2001.0363>
- Parkinson, J. S. (2016). Classic Spotlight: the Discovery of Bacterial Transduction. *Journal of Bacteriology*, 198(21), 2899–2900. <https://doi.org/10.1128/JB.00635-16>
- Pehrsson, E. C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K. M., Calderon, M., Cabrera, L., Hoyos-Arango, W., Bertoli, M. T., Berg, D. E., Gilman, R. H., & Dantas, G. (2016). Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature*, 533(7602), 212–216. <https://doi.org/10.1038/nature17672>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

- Pfeifer, E., Bonnin, R. A., & Rocha, E. P. C. (2022). Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. *MBio*, 13(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01851-22>
- Piergiacomo, F., Borruso, L., Ciccazzo, S., Rizzi, S., Zerbe, S., & Brusetti, L. (2020). Environmental Distribution of AR Class 1 Integrons in Upper Adige River Catchment (Northern Italy). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072336>
- Pires, J., Santos, R., & Monteiro, S. (2023). Antibiotic resistance genes in bacteriophages from wastewater treatment plant and hospital wastewaters. *Science of The Total Environment*, 892, 164708. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164708>
- Puga-Torres, B., Aragón, E., Contreras, A., Escobar, D., Guevara, K., Herrera, L., López, N., Luje, D., Martínez, M., Sánchez, L., Tapia, D., Villarreal, T., & Núñez, L. (2024). Analysis of quality and antibiotic residues in raw milk marketed informally in the Province of Pichincha – Ecuador. *Food and Agricultural Immunology*, 35(1). <https://doi.org/10.1080/09540105.2023.2291321>
- Quirós, P., Colomer-Lluch, M., Martínez-Castillo, A., Miró, E., Argente, M., Jofre, J., Navarro, F., & Muniesa, M. (2014). Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 606–609. <https://doi.org/10.1128/AAC.01684-13>
- Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
- Reinoso, I. (2015). *Evaluación ambiental del río Machángara*. Escuela Politécnica Nacional.
- Ron, S. (2020, December 24). *Regiones Naturales*. <https://Bioweb.Bio/Faunaweb/Amphibiaweb/RegionesNaturales>.
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Schmieger, H., & Schicklmaier, P. (1999). Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13381.x>
- Shin, H., Kim, Y., Raza, S., Unno, T., Ryu, S.-H., & Hur, H.-G. (2022). Dynamics of Genotypic and Phenotypic Antibiotic Resistance in a Conventional Wastewater Treatment Plant in 2 Years. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.898339>

- Shokravi, Z., Mehrad, L., & Ramazani, A. (2015). Detecting the frequency of aminoglycoside modifying enzyme encoding genes among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioImpacts : BI*, 5(2), 87–91. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.15>
- Shousha, A., Awaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F. J. M., Paulsen, P., Szostak, M. P., Humphrey, T., & Hilbert, F. (2015). Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4600–4606. <https://doi.org/10.1128/AEM.00872-15>
- Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W. (2003). Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4089–4094. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>
- Sun, D. (2018). Pull in and Push Out: Mechanisms of Horizontal Gene Transfer in Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02154>
- Taylor, V. L., Fitzpatrick, A. D., Islam, Z., & Maxwell, K. L. (2019). *The Diverse Impacts of Phage Morons on Bacterial Fitness and Virulence* (pp. 1–31). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.08.001>
- Torres-Barceló, C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 168. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>
- UBUKATA, K., KONNO, M., & FUJII, R. (1975). Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Antibiotics*, 28(9), 681–688. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.681>
- Udo, E. E., & Dashti, A. A. (2000). Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13(4), 273–279. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00124-7)
- Volkman, H., Schwartz, T., Bischoff, P., Kirchen, S., & Obst, U. (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *Journal of Microbiological Methods*, 56(2), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>
- Watson, B. N. J., Staals, R. H. J., & Fineran, P. C. (2018). CRISPR-Cas-Mediated Phage Resistance Enhances Horizontal Gene Transfer by Transduction. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02406-17>
- Wernli, D., Jørgensen, P. S., Morel, C. M., Carroll, S., Harbarth, S., Levrat, N., & Pittet, D. (2017). Mapping global policy discourse on antimicrobial resistance. *BMJ Global Health*, 2(2), e000378. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000378>

- Wickham, H. (2016). *ggplot2*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2023, November 16). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4*. <https://Cran.r-Project.Org/Web/Packages/Dplyr/Dplyr.Pdf>.
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Yang, Y., Shi, W., Lu, S.-Y., Liu, J., Liang, H., Yang, Y., Duan, G., Li, Y., Wang, H., & Zhang, A. (2018). Prevalence of antibiotic resistance genes in bacteriophage DNA fraction from Funan River water in Sichuan, China. *Science of The Total Environment*, 626, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.148>
- Zhang, X.-X., & Zhang, T. (2011). Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations. *Environmental Science & Technology*, 45(7), 2598–2604. <https://doi.org/10.1021/es103672x>
- Zhaxybayeva, O., & Doolittle, W. F. (2011). Lateral gene transfer. *Current Biology*, 21(7), R242–R246. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.045>
- Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., & Papke, R. T. (2006). Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: Quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Research*, 16(9), 1099–1108. <https://doi.org/10.1101/gr.5322306>

Tabla 1: *Primers* utilizados en este estudio

Gen objetivo	Dirección de secuencia (5' - 3')	amplicón (pb)	Reference	
<i>mrc-1</i>	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	(Rebelo et al., 2018)	
	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mrc-2</i>	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715		
	TCTAGCCCGACAAGCATACC			
<i>mrc-3</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929		
	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mrc-4</i>	TCACTTTCATCACTGCGTTG	116		
	TTGGTCCATGACTACCAATG			
<i>mrc-5</i>	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644		(Borowiak et al., 2017)
	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			
<i>tet-(A)</i>	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	210	(Ng et al., 2001)	
	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
<i>tet-(B)</i>	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	659		
	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG			
<i>tet-(C)</i>	CTT GAG AGC CTT CAA CCC AG	418		
	ATG GTC GTC ATC TAC CTG CC			
	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC			
<i>fosA</i>	CATCTGACSCTSGCGGTCAG	316	(Freire et al., 2023)	
	TGCAGYTCCAGYTTRTGSCC			
<i>fosC</i>	TGGAGGCTACTTGGATTTG	217		
	AGGCTACCGCTATGGATTT			
<i>fosL</i>	GCCAAGCTAATTCAAAAAGGC	140		
	ACACGACATTGCTTCAAG CG			
<i>sul1</i>	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	433	(Kern, 2002)	
	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG			
<i>sul2</i>	GCGCTCAAGGCAGA TGGCA TT	293		
	GCGTTTGATAACCGGCACCCGT			
<i>sul3</i>	CAGATAAGGCAATTGAGCATGCTCTGC	569	(Wu et al., 2010b)	
	AGAATGATTTCCGTGACACTGCAATCAT			
<i>mecA</i>	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	532	(Strommenger et al., 2003)	
	AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC			
<i>aacA-aphD</i>	TAATCCAAGAGCAATAAGGGC	227		
	GCCACACTATCATAACCACTA			
<i>erm(A)</i>	AAGCGGTAAACCCCTCTGA	190		
	TTCGCAAATCCCTTCTCAAC			



<i>erm(C)</i>	AATCGTCAATTCCTGCATGT	299	
	TAATCGTGGAATACGGGTTTG		
<i>aph(30)-IIIa</i>	GCCGATGTGGATTGCGAAAA	269	(Udo & Dashti, 2000)
	GCTTGATCCCCAGTAAGTCA		
<i>blaCTX-M</i>	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	539	(Hasibuan et al., 2018)
	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
<b>16S</b>	CCTACGGGNGGCWGCAG	464	(Klindworth et al., 2013)
	GACTACHVGGGTATCTAATCC		
<i>intI1</i>	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	484	Mazel et al., 2000)
	ACATGCGTGTAATCATCGTCG		

F: Forward primer,R: Reverse primer.

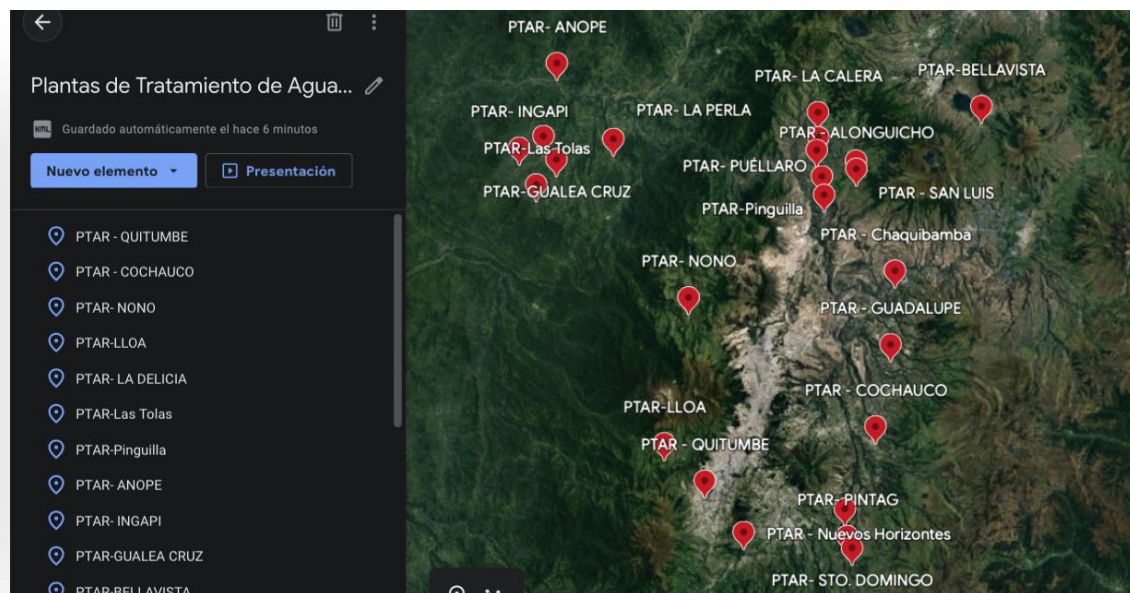


Figura 1.: Ubicación de los puntos de muestreo. Los afluentes de 27 Plantas de tratamiento de agua residual, distribuidas en diferentes parroquias del cantón Quito, fueron muestreados en un período de estiaje durante los meses de Junio, Julio y Agosto del 2023.

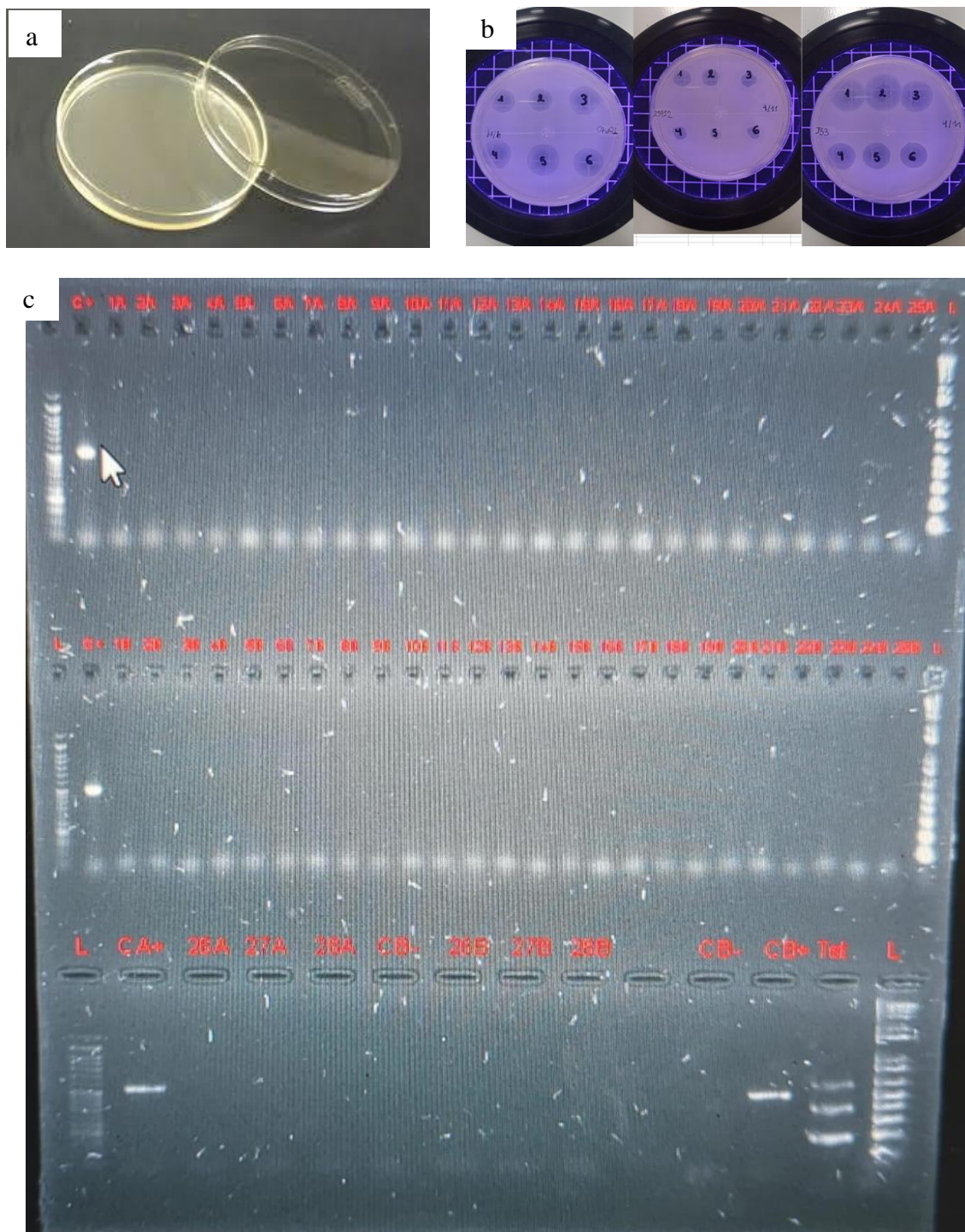


Figura 2: Controles pre-extracción de ADN. a. ausencia de colonias bacterianas en placa (LB), cada uno de los 81 concentrados fueron cultivados por extensión en placa, después de ser filtrados ( $0,22 \mu\text{M}$  PES) y expuestos a cloroformo (10% v/v). b. Ensayo spot-test, las muestras reflejan la presencia de bacteriófagos al lisar *E. coli* ATCC (25922, Top 10, J53). c. acción enzimática DNAsa y RNAsa para eliminación de ácidos nucleicos extraviarales, todos los concentrados reflejaron ausencia total del gen ribosomal (*16s*) mediante su identificación por PCR.

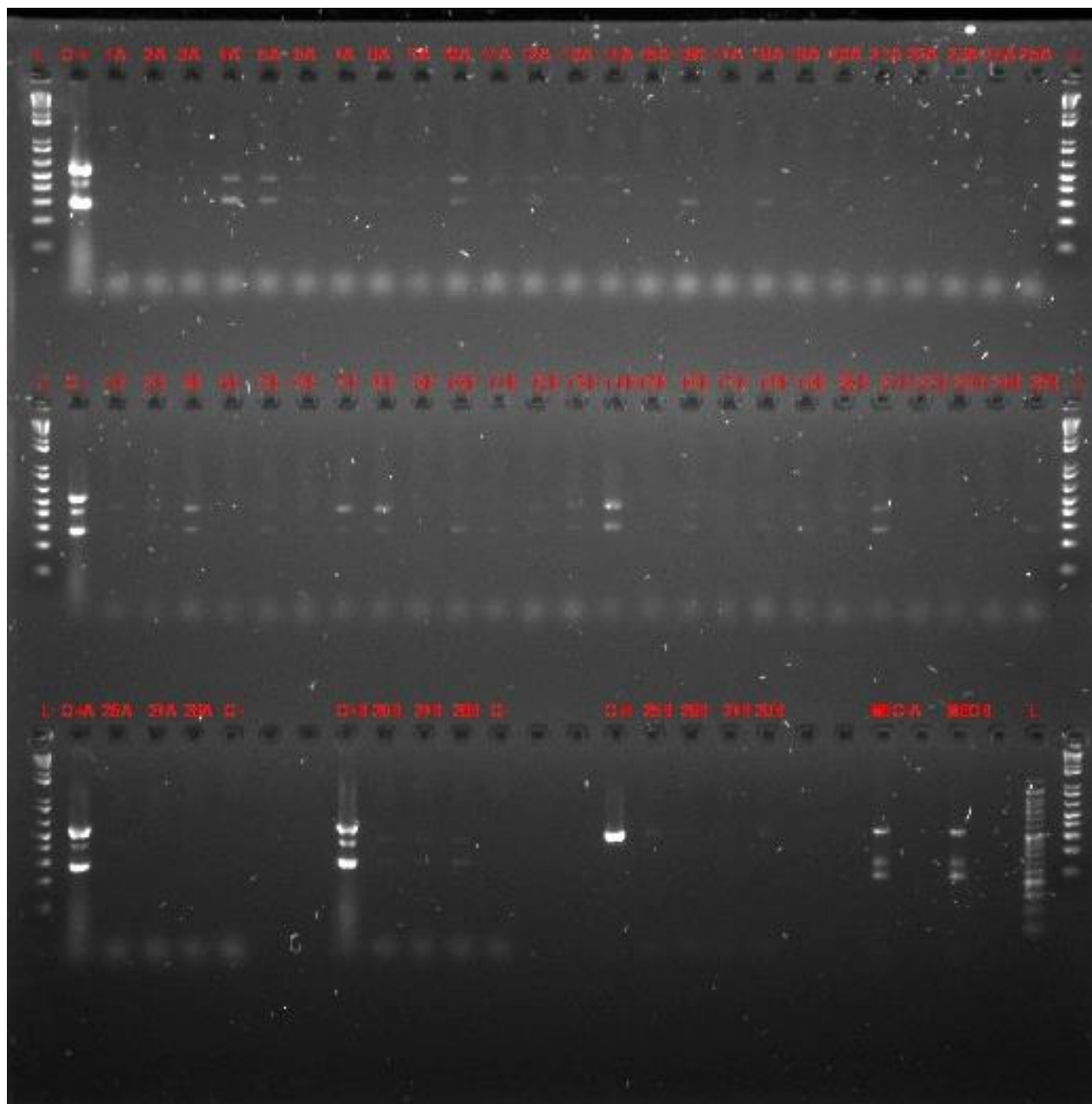
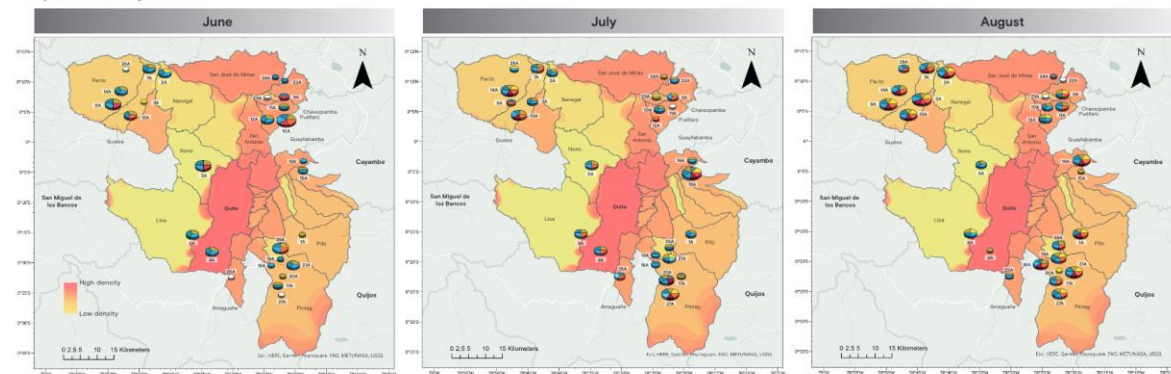
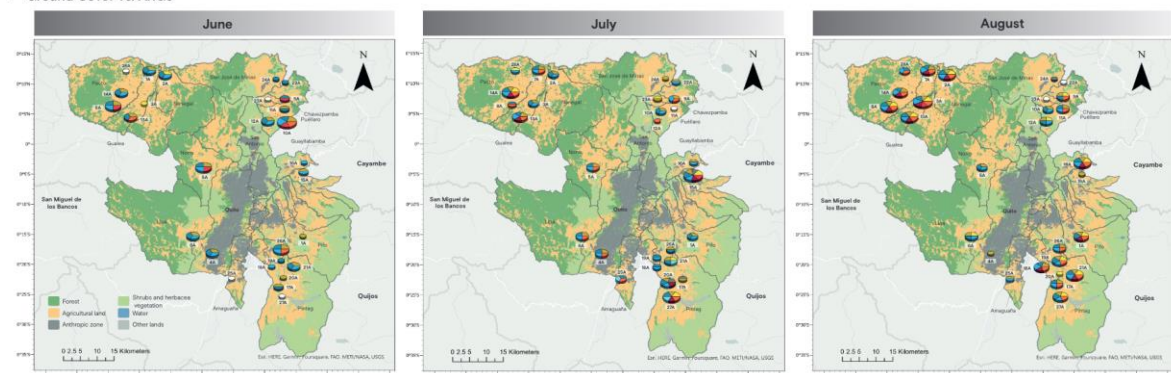


Figura 3: electroforesis en gel de agarosa para la identificación de resistencias a la sulfonamidas *sul-1* (433 pb), *sul-2* (293 pb) y *sul-3* (569 pb) del mes de Junio (L: ladder 100 pb).

• Population Density vs. ARGs



• Ground Cover vs. ARGs



Antibiotic Resistance Genes (ARGs)



Wastewater Treatment Plants

1A Cochacuco	2A La Peña	3A Gualea Cruz	4A Oulumbi	5A Nono	6A Liza	7A Betalaita	8A Ingapi	9A San Luis de Alongaicho	10A Pirguilla	11A Alongaicho	12A Paullaro
13A Las Tolas	14A La Delicia	15A Cachuco	16A Chaguibamba	17A Yucac	18A Chachi	19A Vialfara	20A El Chorro	21A Santo Domingo	22A La Calera	23A Chavespamba	24A La Mercad
25A Nuevos Horizontes	26A San Juanito	27A Pinatara	28A Anope								

Figura 4: Identificación trimestral de genes de resistencia en afluentes de 27 WWTP's (Population density and ground cover).

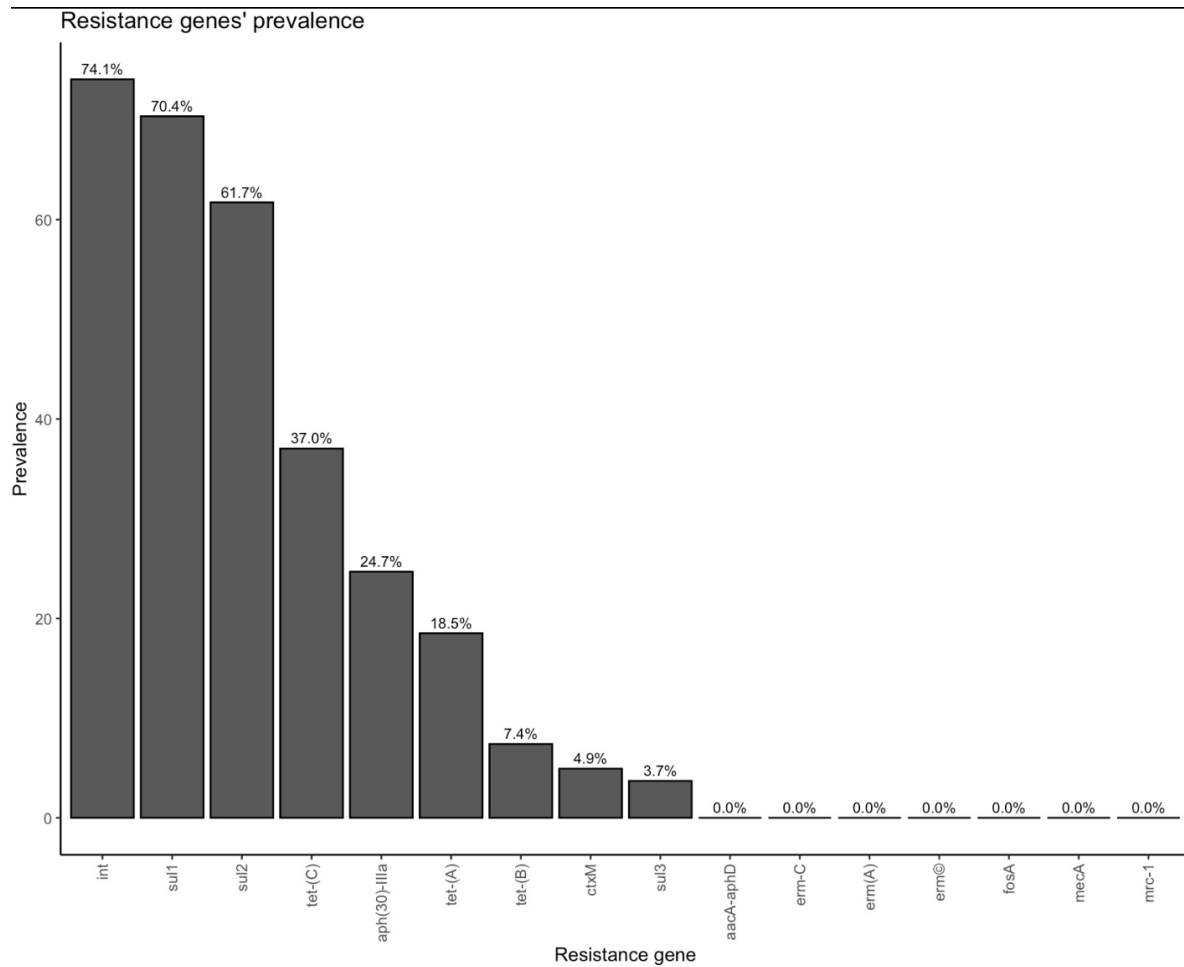


Figura 5: Prevalencia de ARG's objetivo en los afluentes de los WWTP's. 8 de los 15 ARG's son identificados durante los tres meses evaluados, se identifica una considerable correlación de estos genes con gen *int11* ( $p < 0.001$ ).

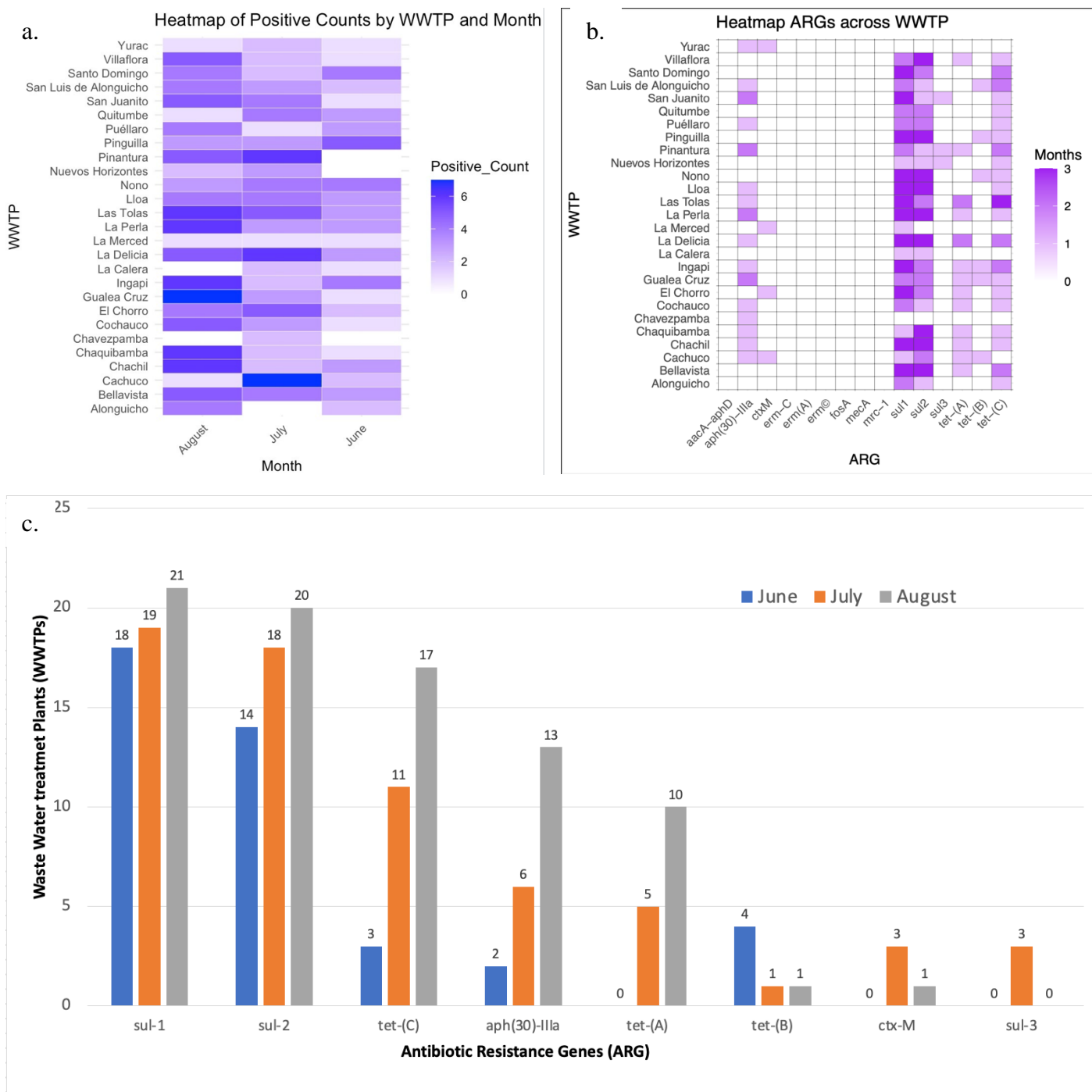


Figura 6: a. Conteo positivo por cada WWTP y por cada mes. b. Positividad por ARG en el trimestre evaluado c. Positividad mensual de cada ARG por WWTP.

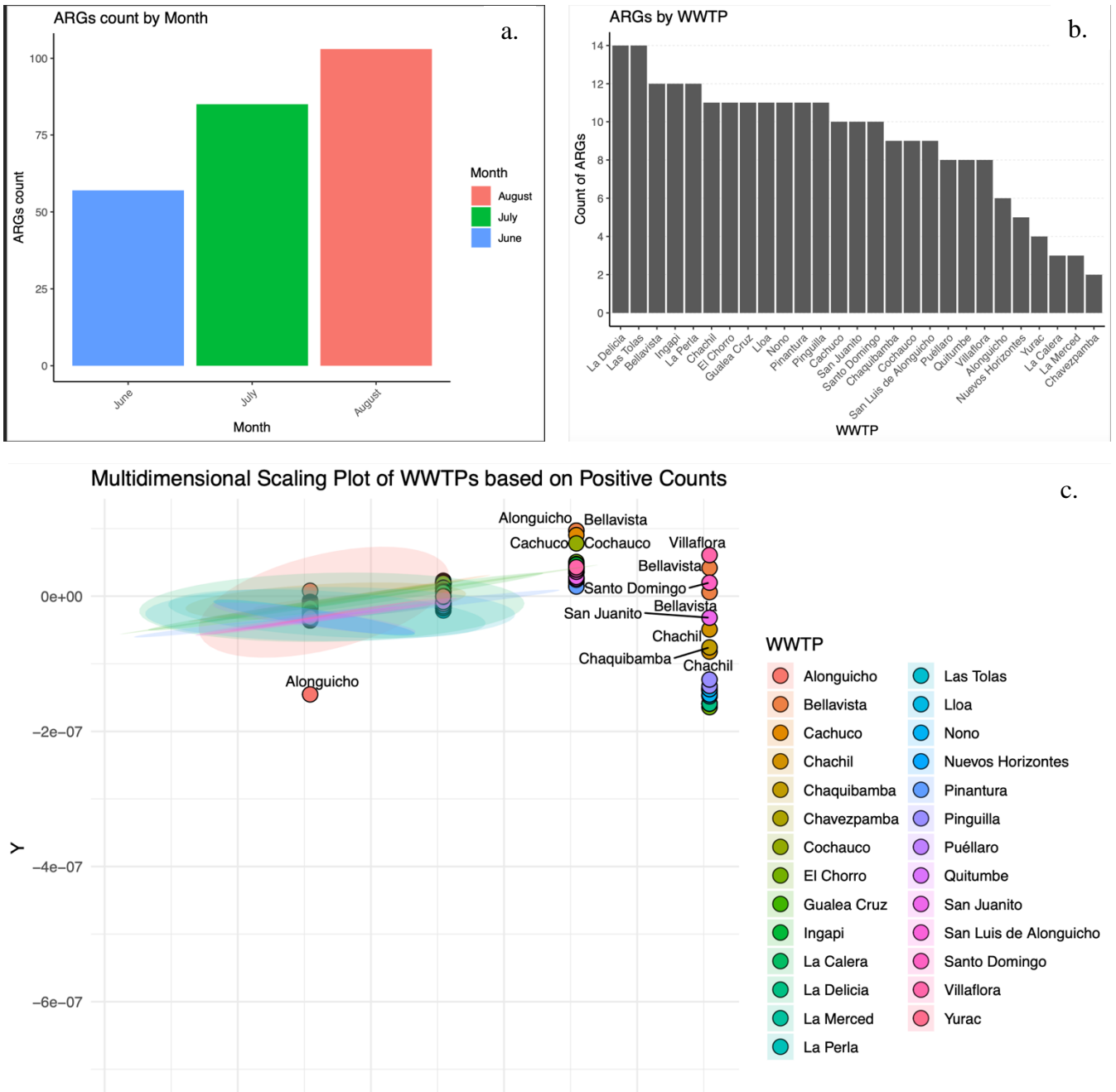


Figura 7: a.Sumatoria de positividad mensual de ARG por mes. b.Sumatoria de positividad de ARG por WWTP. c.Análisis multidimensional de la variabilidad de ARG.

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Coordenadas de WWTP's.....	49.
ANEXO B. Condiciones de PCR ARG's.....	50.
ANEXO C. estandarización de PCR's: ARG's e <i>intl1</i> .....	51.



**ANEXO A: COORDENADAS DE WWTP'S**

N°	WWTP'S	COORDENADAS		PARROQUIA
1	Cochauco	0° 15' 14.903" S	78° 18' 52.103" W	Pifo
2	La Perla	0° 11' 34.974" N	78° 41' 5.023" W	Nanegal
3	Gualea Cruz	0°06'47.4" N	78° 44'16.2" W	Gualea
4	Quitumbe	0° 18' 2.495" S	78° 33' 21.608" W	Quitumbe
5	Nono	0° 3' 46.5" S	78° 34' 46.023" W	Nono
6	Lloa	0° 15' 12.748" S	78° 36' 28.186" W	Lloa
7	Bellavista	0°12'19.0980" N	78°43'26.3400" W	Gualea
8	Ingapi	0°07'45.310" N	78°47'40.1880" W	Pacto
9	San Luis de Alonguicho	0°06'19.6920" N	78°21'46.6200" W	Puéllaro
10	Pinguilla	0°04'27.8300" N	78°23'55.5000" W	Puéllaro
11	Alonguicho	0°05'55.6560" N	78°21'48.3300" W	Puéllaro
12	Puéllaro	0°03'53.1"N	78°24'28.6"W	Puellaro
13	Las Tolas	0°04'32.9040" N	78°46'25.9020" W	Gualea
14	La Delicia	0°8'37.5420" N	78°47'53.2720 W	Pacto
15	Cachuco	0° 3' 4.841" S	78° 18' 45.661" W	Guayllabamba
16	Chaquibamba	0°03'00.3" S	78°18'41.0" W	Puéllaro
17	Yurac	0° 22' 16.836" S	78° 21' 59.907" W	Pintag
18	Chachil	0° 20' 16.152" S	78° 22' 39.715" W	Pintag
19	Villaflora	0° 20' 20.204" S	78° 23' 44.679" W	Pintag
20	El Chorro	0° 23' 44.123" S	78° 22' 47.26" W	Pintag
21	Santo Domingo	0° 19' 18.416" S	78° 22' 21.146" W	Pintag
22	La Calera	0°10'18.9660" N	78°22'26.0880" W	San José de Minas
23	Chavezpamba	0° 7' 32.704" N	78° 24' 26.27" W	Chavezpamba
24	La Merced	0° 10' 53.973" N	78° 23' 10.65" W	San José de Minas
25	Nuevos Horizontes	0° 22' 17.004" S	78° 30' 16.421" W	Amaguaña
26	San Juanito	0° 19' 18.416" S	78° 22' 21.146" W	Pintag
27	Pinantura	0° 25' 14.626" S	78° 22' 11.782" W	Pintag

Tabla suplementaria 1: coordenadas de WWTP's muestreadas trimestralmente

**ANEXO B: CONDICIONES DE PCR ARG'S, 16S, INTL1 .**

<b>Primer</b>	<b>C. Final C2 (µM)</b>	<b>Condiciones de corrida</b>
mrc-1-F	0,2	Denaturación (94°C, 15 min), 25 ciclos a: ( 94 °C, 30 s), ( 58 °C, 90 s) y (72°C, 60 s). Y, ( 72°C for 10 min).
mrc-1-R		
mrc-2-F		
mrc-2-R		
mrc-3-F		
mrc-3-R		
mrc-4-F		
mrc-4-R		
mrc-5-F		
mrc-5-R		
tet-(A) F	1	Denaturación (94°C, 5 min), 35 ciclos a: ( 94 °C, 1 min), ( 55 °C, 1min) y (72°C, 1 min). Y, ( 72°C for 5 min).
tet-(A) R		
tet-(B) F	0,25	
tet-(B) R		
tet-(C) F		
tet-(C) R		
fosA F	0,2	Denaturación (95°C, 5 min), 35 ciclos a: ( 95 °C, 30 s), ( 58 °C, 30 s) y (72°C, 60 s). Y, ( 72°C for 10 min).
fosA R		
fosC F		
fosL F		
fosL R		
sul1 F	0,2	Denaturación (95°C, 5 min), 30 ciclos a: ( 94 °C, 1 min), ( 68 °C, 1 min) y (72°C, 2 min s). Y, ( 72°C for 10 min).
sul1 R		
sul2 F		
sul2 R		
sul3 F		
sul3 R		
mecA F	0,1	Denaturación (95°C, 3 min), 30 ciclos a: ( 94 °C, 30 s), ( 55 °C, 30 s) y (72°C, 30 s). Y, ( 72°C for 4 min).
mecA R		
aacA-aphD F		
aacA-aphD R		
erm(A) F		
erm(A) R		
erm(C) F		
erm(C) R		
aph(30)-IIIaF	0,3	Denaturación (95°C, 10min), 32 ciclos a: ( 94 °C, 3min), ( 60 °C, 45 s) y (72°C, 60 s). Y, ( 72°C for 5 min).
aph(30)-IIIaR		
bact 341 F	0,3	Denaturación (94°C, 3 min), 30 ciclos a: ( 94 °C, 30 s), ( 55 °C, 30 s) y (72°C, 30 s). Y, ( 72°C for 5 min).
bact 785 R		
intI1 F	0,25	Denaturación (94°C, 3 min), 30 ciclos a: ( 94 °C, 30 s), ( 55 °C, 30 s) y (72°C, 30 s). Y, ( 72°C for 5 min).
intI1 R		

Tabla suplementaria 2: concentración de *primers* y condiciones de PCR.

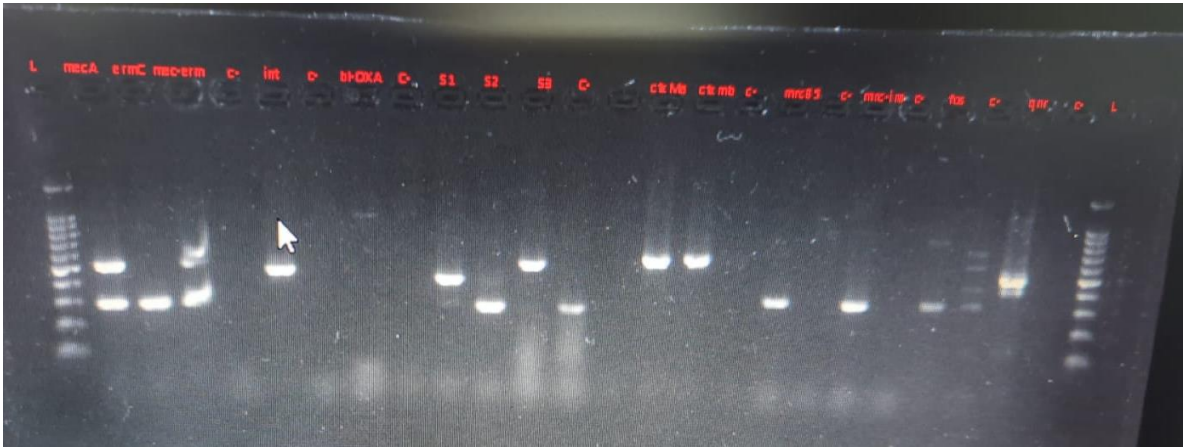
**ANEXO C: ESTANDARIZACIÓN DE PCR'S ARG'S E INTL1**

Figura suplementaria 1: estandarización de PCR's: ARG's e *intl1*.