

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Bioquímica y Biología Molecular



Identificación metagenómica de genes resistentes a antibióticos en bacterias de la bahía interior de Puno y Captación Chimu - Puno 2023

Tesis presentada por la Bachiller:

Coaquira Adco, Nilda

ORCID: 0009-0006-6996-5785

Para optar el Grado Académico de Maestro en Bioquímica y Biología Molecular

Asesor:

Dr. Villanueva Salas, José Antonio

ORCID: 0000-0001-6050-0101

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSTGRADO
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR DE TESIS

Arequipa, 11 de Junio del 2025

Dictamen: 010138-C-EPG-2025

Visto el borrador del expediente 010138, presentado por:

2022002802 - COAQUIRA ADCO NILDA

Titulado:

**IDENTIFICACIÓN METAGENÓMICA DE GENES RESISTENTES A ANTIBIOTICOS EN BACTERIAS
DE LA BAHÍA INTERIOR Y CAPTACION CHIMU - PUNO 2023.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29285302 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE CANDELARIA
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR**



**43570415 - VILLEGAS LLERENA CLAUDIO NICOLAS
DICTAMINADOR**



Identificación metagenómica de genes resistentes a antibióticos en bacterias de la bahía interior y Captación Chimu - Puno 2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

25%

INDICE DE SIMILITUD

21%

FUENTES DE INTERNET

11%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

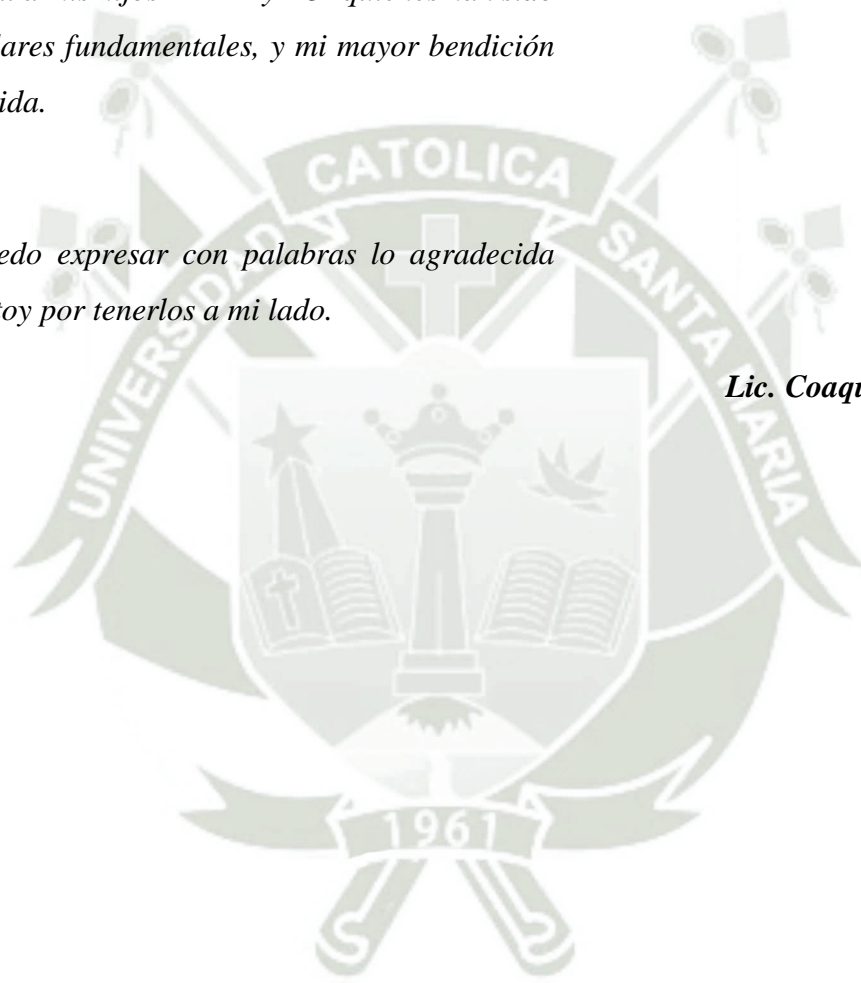
1	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	6%
2	repositorio.upsc.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	doczz.es Fuente de Internet	1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	Alicia, Hermoza Gutierrez Marian. "Biodegradación de polietileno de baja densidad efectuada por microorganismos adaptados a las condiciones altoandinas en aguas residuales urbanas de la ciudad de Puno", Universidad Nacional del Altiplano de Puno (Peru) Publicación	1%

DEDICATORIA

Llena de regocijo, de amor y de esperanza, dedico esta tesis a cada uno de mis seres queridos en especial a mis hijos KAELI y AOI quienes han sido mis pilares fundamentales, y mi mayor bendición en la vida.

No puedo expresar con palabras lo agradecida que estoy por tenerlos a mi lado.

Lic. Coaquira Adco Nilda



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jose A. Villanueva S. por su sapiencia y asesoramiento. Como especialista en investigación, cada uno de sus recomendaciones y consejos ha logrado que esta tesis tenga las bases sólidas que un trabajo de investigación amerita.

A la UCSM institución en la cual realice mis estudios de maestría, cristalizando mi formación académica con la presente investigación.

En este sentido, quiero agradecer a la Dra. María Trinidad Romero Torres, docente principal de la UNA Puno, quien confió en mí como tesista en el laboratorio de Biología Molecular del Megalaboratorio de la UNA Puno, y a todo el personal que allí labora, por su guía constante.

Lic. Coaquira Adco Nilda

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de ARG en metagenomas de consorcios bacterianos de la Bahía Interior y Captación Chimu del Lago Titicaca mediante secuenciación metagenómica shotgun, un método que permite fragmentar el ADN en segmentos de diferentes tamaños, secuenciarlo masivamente y ensamblarlo computacionalmente para la reconstrucción del genoma completo. La calidad de las secuencias fue evaluada a través de la plataforma Galaxy, y el ensamblaje de los genes se realizó con el programa MEGAHIT, utilizando la base de datos CARD para la identificación de ARG en las muestras analizadas. Los resultados obtenidos reportan que en la Bahía Interior los genes con mayor cobertura fueron vanYB (30.08%), asociado a resistencia a glicopéptidos como la vancomicina en *Enterococcus faecium*; dfrB1 (8.86%), relacionado con resistencia a trimetoprima en *Escherichia coli*; catV (7.27%), que confiere resistencia a cloranfenicol en *Brevibacillus brevis*; y Ecol_emrE (6.31%), involucrado en la resistencia a fluoroquinolonas en *E. coli*, mientras que en la Captación Chimu los ARG con mayor cobertura fueron vanYB (42.75%), vanWI (20.59%), asociado a resistencia a vancomicina en *Enterococcus faecalis*; evgA (4.39%), que regula bombas de eflujo responsables de la resistencia a β -lactámicos en *E. coli*; y OXA-726, vinculada a resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii*. En total, se identificaron 28 ARG en la Bahía Interior y 35 ARG en la Captación Chimu, concluyéndose que vanYB es el ARG con mayor cobertura en ambas zonas, y que los genes dfrB1, catV, vanWI y evgA son los más representativos, lo que resalta la necesidad de implementar estrategias de monitoreo y control para mitigar la propagación de la resistencia antimicrobiana en el Lago Titicaca.

Palabras Clave: ARG, metagenomas, CARD.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the presence of ARGs in metagenomes of bacterial consortia from the Interior Bay and Chimu Intake of Lake Titicaca through shotgun metagenomic sequencing, a method that allows for the fragmentation of DNA into segments of different sizes, massive sequencing, and computational assembly for the reconstruction of the complete genome. The quality of the sequences was evaluated using the Galaxy platform, and the assembly of the genes was performed with the MEGAHIT program, utilizing the CARD database for the identification of ARGs in the analyzed samples. The results reported that in the Interior Bay, the genes with the highest coverage were vanYB (30.08%), associated with glycopeptide resistance such as vancomycin in *Enterococcus faecium*; dfrB1 (8.86%), related to trimethoprim resistance in *Escherichia coli*; catV (7.27%), which confers chloramphenicol resistance in *Brevibacillus brevis*; and Ecol_emrE (6.31%), involved in fluoroquinolone resistance in *E. coli*. Meanwhile, in the Chimu Intake, the ARGs with the highest coverage were vanYB (42.75%), vanWI (20.59%), associated with vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*; evgA (4.39%), which regulates efflux pumps responsible for β -lactam resistance in *E. coli*; and OXA-726, linked to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. In total, 28 ARGs were identified in the Interior Bay and 35 ARGs in the Chimu Intake, concluding that vanYB is the ARG with the highest coverage in both areas, and that the genes dfrB1, catV, vanWI, and evgA are the most representative, highlighting the need to implement monitoring and control strategies to mitigate the spread of antimicrobial resistance in Lake Titicaca.

Key Words: ARG, metagenomes, CARD.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
CAPÍTULO I	6
MARCO TEORICO	6
1.1. LAGO TITICACA	6
1.1.1. Bahía interior	6
1.1.2. Captación Chimu	6
1.1.3. Contaminación del Lago Titicaca	7
1.1.4. Microbioma del Lago Titicaca	7
1.2. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG)	8
1.3. EXTRACCIÓN DE ADN EN MICROBIOMAS	9
1.3.1. Concentración del ADN	10

1.3.2.	Calidad del ADN	10
1.3.3.	Integridad del ADN	10
1.3.4.	Secuenciamiento por Shotgun.....	11
1.3.5.	Análisis de metagenomas por Galaxy.....	12
1.3.6.	Base de datos CARD	12
CAPÍTULO II.....		13
METODOLOGÍA.....		13
2.1.	ÁMBITO DE ESTUDIO	13
2.1.1.	Recolección de las muestras de agua.....	14
2.1.2.	Filtración de muestras.....	15
2.2.	EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE AGUA FILTRADAS .	16
2.2.1.	Concentración del ADN.....	17
2.2.2.	Calidad del ADN	17
2.2.3.	Integridad del ADN	17
2.3.	SECUENCIAMIENTO DEL ADN EXTRAÍDO.....	18
2.3.1.	Análisis bioinformático.....	19
2.3.2.	Variables e Indicadores.....	19
CAPÍTULO III		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
3.1.	EVALUACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO	21
3.1.1.	Concentración del ADN extraído en la Bahía Interior y la Captación Chimu	21
3.1.2.	Calidad del ADN extraído en la Bahía Interior y la Captación Chimu	22
3.1.3.	Integridad del ADN en la Bahía Interior y la Captación Chimu	24
3.1.4.	Resultados del Análisis Bioinformático de Metagenomas de Consorcios Bacterianos del Lago Titicaca	24
3.2.	EVALUACIÓN DEL ADN SECUENCIADO EN LA BAHÍA INTERIOR Y LA CAPTACIÓN CHIMU.....	26

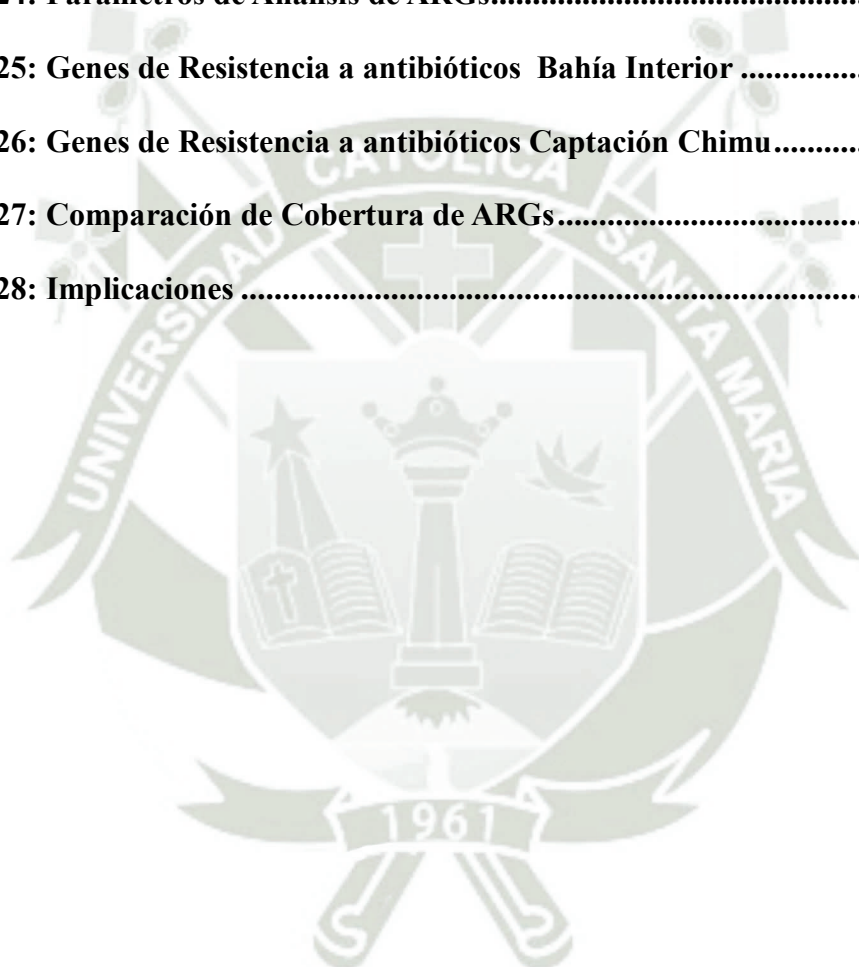
3.2.1.	Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado	26
3.2.2.	Calidad del ADN secuenciado por secuencias de bases	28
3.2.3.	Resultados de la Evaluación de la Abundancia de ARG	30
3.3.	IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG).....	32
3.3.1.	Genes de resistencia a antibióticos de la Bahía Interior	32
3.3.2.	Genes de Resistencia a antibióticos de la Captación Chimú	33
3.3.3.	Resultados del Resistoma de los Metagenomas	34
3.4.	DEFINICIÓN DE LOS ARG MAS REPRESENTATIVOS PRESENTES EN LA BAHÍA INTERIOR Y CAPTACIÓN CHIMU	35
3.4.1.	VanYB	35
3.4.2.	dfrB1	36
3.4.3.	catV	36
3.4.4.	Ecol emrE.....	37
3.4.5.	VanWI.....	37
3.4.6.	EvgA	38
3.4.7.	OXA-726.....	38
3.5.	DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE METAGENOMAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS EN EL LAGO TITICACA: IMPLICACIONES PARA LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y LA SALUD PÚBLICA.....	39
3.5.1.	Evaluación de la Calidad y Concentración del ADN extraído	39
3.5.1.1.	Integridad del ADN y su relevancia para el análisis Bioinformático	42
3.5.1.2.	Diversidad y Abundancia de Genes de Resistencia a Antibióticos en el Lago Titicaca.....	43
3.5.1.3.	Comparación de la Presión Selectiva en la Bahía Interior y la Captación Chimú	44
3.5.2.	DISCUSIÓN EVALUACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN METAGENOMAS DE	

CONSORCIOS BACTERIANOS DE LA BAHÍA INTERIOR Y LA CAPTACIÓN CHIMU DEL LAGO TITICACA.....	46
3.5.2.1. Datos estadísticos y Comparación del ADN secuenciado	46
3.5.2.2. Comparación de la Abundancia entre Sitios	47
3.5.2.3. Calidad de ADN Secuenciado.....	49
3.5.3. DISCUSIÓN ANÁLISIS DEL RESISTOMA EN LOS METAGENOMAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS DE LA BAHÍA INTERIOR Y CAPTACIÓN CHIMU DEL LAGO TITICACA.....	50
3.5.3.1. Parámetros de Análisis de ARGs	50
3.5.3.2. Genes de Resistencia a Antibióticos en la Bahía Interna y Captación Chimu	51
3.5.3.3. Cobertura y Abundancia de ARGs	53
3.5.3.4. Discusión de Resultados con Estudios Anteriores.	56
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	61
ANEXO	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01: Coordenadas de los Puntos de Muestreo de la Bahía Interior.	15
Tabla 02: Coordenadas de los Puntos de Muestreo de la Captación Chimú.	15
Tabla 03: Resultados de la concentración de ADN en la Bahía Interior.	21
Tabla 04: Resultados de la concentración de ADN en la Captación Chimú.	22
Tabla 05: Resultados de la calidad de ADN en la Bahía Interior.	23
Tabla 06: Resultados de la calidad de ADN en la Captación Chimú.....	23
Tabla 07: Resultados de análisis bioinformático de metagenomas de Consorcio Bacterianos en la Bahía Interior y Captación Chimú.	25
Tabla 08: Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado en la Bahía Interior	27
Tabla 09: Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado en la Captación Chimú.....	28
Tabla 10: Resultados de la Evaluación de Abundancia de ARG en la Bahía Interior y Captación Chimú.	31
Tabla 11: Resumen de los parámetros utilizados en el análisis con ARG Pipeline versión 1.3.2.....	32
Tabla 12: Valores representativos de los cuadros ARG con mayor cobertura en la Bahía Interior.....	33
Tabla 13: Valores representativos de los cuadros ARG con mayor cobertura en la Captación Chimú	34
Tabla 14: Resultados del Resistoma de los Metagenomas en la Bahía Interior y Captación Chimú	35
Tabla 15: Concentración de ADN extraído	39
Tabla 16: Calidad del ADN extraído	40
Tabla 17: Integridad de ADN.....	42

Tabla 18: Análisis Bioinformático de ARG	43
Tabla 19: Comparación de % GC entre Bahía Interior y Captación Chimu	45
Tabla 20: Datos estadísticos de ADN secuenciado Bahía Interior y Captación Chimu ...	46
Tabla 21: Abundancia de los Genes de Resistencia encontrados.....	47
Tabla 22: Abundancia de los Genes de Resistencia a Antibióticos	48
Tabla 24: Parámetros de Análisis de ARGs.....	51
Tabla 25: Genes de Resistencia a antibióticos Bahía Interior	51
Tabla 26: Genes de Resistencia a antibióticos Captación Chimu.....	52
Tabla 27: Comparación de Cobertura de ARGs.....	53
Tabla 28: Implicaciones	55



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Flujo de trabajo para el secuenciamiento por Shotgun (14).....	12
Figura 02: Punto de muestreo en la Bahía Interior de Puno, Perú (Google Earth).....	13
Figura 03: Punto de muestreo en la Captación Chimu de Puno, Perú (Google Earth).....	13
Figura 04: Esterilización por UV de bidones para la toma de muestras de agua (Laboratorio de Biología Molecular – UNA -Puno)	14
Figura 05: Sistema de filtración para muestras de agua (Laboratorio de Biología Molecular – UNA -Puno).....	16
Figura 06: Resultado de Integridad del ADN en la Bahía Interior y la Captación Chimu (Laboratorio de Biología Molecular – UNA Puno)	24
Figura 07: Calidad por secuencia de bases del ADN secuenciado en la Bahía Interior (usagalaxy)	29
Figura 08: Calidad por secuencia de bases del ADN secuenciado en la Captación Chimu (usagalaxy)	30
Figura 09: Concentración de ADN en la Bahía Interior y Captación Chimu	40
Figura 10: Concentración de ADN en la Bahía Interior y Captación Chimu	41
Figura 11: Abundancia de ARG en ambas muestras	44
Figura 12: Comparación de % GC entre Bahía Interior y Captación Chimu	45
Figura 13: Abundancia de los Genes a Resistencia a Antibióticos	48
Figura 14: Calidad de ADN Secuenciado	49
Figura 15: Comparación de Cobertura de ARGs	54
Figura 16: Abundancia de genes de Resistencia a antibióticos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ARG	:	Genes de resistencia a antibióticos.
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico.
ARN	:	Ácido ribonucleico
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa.
CARD	:	Base de datos completa sobre resistencia a los antibióticos.
HGT	:	transferencia horizontal de genes.
NGS	:	Secuenciación de Nueva Generación
UNA	:	Universidad Nacional del Altiplano.



INTRODUCCIÓN

Los lagos son fuentes de agua dulce muy importantes, conteniendo casi el 90% de agua dulce en el mundo. No obstante, poseen tiempos largos de retención que generan la circulación lenta de los contaminantes, y desencadena un alto riesgo ecológico en la salud (1).

Desde el descubrimiento de la penicilina, se han logrado avances significativos en el desarrollo de antibióticos (2) impulsando la expansión de diversas industrias, no solo en la medicina humana, sino también en la veterinaria, ganadería y acuicultura. El uso constante de antibióticos ha provocado su acumulación en productos de consumo humano y la aparición de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en bacterias y patógenos, que pueden intercambiarse entre sí. (3,4).

Los ambientes acuáticos son la mayor fuente de almacenamiento tanto de antibióticos como de ARG. Teniendo como principal fuente de contaminación los efluentes de hospitales, industrias, plantas de tratamiento de aguas residuales, granjas, y desechos, productos de acuicultura, terminan desembocando a fuentes de aguas como lagos y ríos (5,6).

Los lagos presentan tiempos de retención de contaminantes significativamente más prolongados en comparación con los ríos. Por ello, los afluentes contaminados circulan de manera pausada en los lagos, siendo un estado crítico de contaminación en estas fuentes de agua dulce. Se entiende que son estos cuerpos de agua potenciales fuentes de acumulación de ARG (7).

El lago Titicaca es considerado el lago navegable más alto del mundo. Posee una antigüedad aproximada de 3 millones de años. Además, se es consciente de que dicho lago es empleado para el abastecimiento de agua potable de casi toda la población de Puno. A pesar de su inmensa importancia tanto histórica como ambiental, se observó que este ecosistema está constantemente expuesto a contaminantes provenientes de residuos sólidos vertidos por la población, relaves mineros, aguas servidas, entre otros (8).

En adición, el Titicaca es una frontera natural entre los países Bolivia y Perú. Respecto a la parte peruana. Los investigadores reportan que la contaminación de la bahía del interior del lago son en gran parte responsabilidad de las actividades antrópicas y que amerita

proponer estrategias que permitan mitigar esta contaminación, entre los contaminantes, los ARG son los más importantes y menos estudiados (9).

Precisamente, los lagos de gran altitud generalmente representan un ecosistema comparativamente único debido a su lejanía y al corto período de verano de aguas abiertas; sin embargo, están menos explorados en comparación con los lagos de tierras bajas. Siendo los sedimentos una rica fuente de alta diversidad microbiana y por ende microbiomas y ARG presentes en ambientes acuáticos (10).

Entre las metodologías más importantes para un análisis exhaustivo en microbiomas está la de secuenciamiento de metagenomas, comparado a otras técnicas como PCR, qPCR, entre otros; la metagenómica brinda un análisis global de los genes de resistencia a antibióticos en muestras ambientales (11).

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en el medio ambiente permanecen sin cultivar, los enfoques tradicionales basados en cultivos no logran determinar la diversidad taxonómica y funcional de la comunidad microbiana. Por este motivo, el enfoque metagenómico se ha aplicado con éxito a una variedad de ambientes acuáticos (12).

El enfoque metagenómico supera al cultivo microbiano al ayudar al descubrimiento de ARG en bacterias no cultivables directamente del medio ambiente. Este es el principal beneficio de la metagenómica, ya que el cultivo de nuevos microorganismos es una técnica ardua. Estudios previos sobre microbios independientes no cultivados descubrieron que la diversidad de organismos en los lagos salobres es inusualmente alta con una riqueza de especies en comparación con los ecosistemas de agua dulce (13).

Uno de estos métodos, la metagenómica ShotGun, es la secuenciación no dirigida ("ShotGun") de todos los ("meta-") genomas microbianos "genómicos" presentes en una muestra. La secuenciación ShotGun se puede utilizar para realizar un perfil de la composición taxonómica y la detección de ARG y recuperar secuencias genómicas completas. Los enfoques como la secuenciación del gen 16S rRNA de alto rendimiento, que perfilan organismos seleccionados o genes marcadores únicos, a veces se denominan metagenómica, pero este es un nombre inapropiado, ya que no se enfocan en todo el contenido genómico de una muestra.

Para la identificación de ARG es necesario el uso de bases de datos que incluyen combinaciones de plásmidos anotadas manualmente y predichas computacionalmente,

como CARD, se pueden usar para esta tarea y permiten la caracterización del potencial funcional del microbioma. Los ARG altamente conservadas se detectan y cuantifican de manera más consistente en los metagenomas, lo que podría explicar por qué la resistencia a antibióticos a menudo son sorprendentemente consistentes en diferentes muestras y entornos (14).



HIPÓTESIS

Puesto que existe un proceso de contaminación por diferentes residuos de antibióticos, **es probable** que existan genes de resistencia a antibióticos en los metagenomas de consorcios bacterianos de la bahía interior y la captación Chimú del Lago Titicaca.



OBJETIVOS

Objetivo general

1. Determinar la presencia de genes de resistencia a antibióticos en los metagenomas de consorcios bacterianos de la bahía interior y la captación Chimu del Lago Titicaca, considerando que la contaminación por diferentes residuos de antibióticos puede favorecer la aparición de estos genes de resistencia en dichas áreas.

Objetivos específicos

1. Analizar por medio de herramientas bioinformáticas la data obtenida mediante el secuenciamiento shotgun de los metagenomas de consorcios bacterianos de la bahía interior y captación Chimu del Lago Titicaca.
2. Evaluar la abundancia de genes de resistencia a antibióticos en metagenomas de consorcios bacterianos de la bahía interior y la captación Chimu del Lago Titicaca.
3. Realizar el resistoma de los metagenomas de consorcios bacterianos de la bahía interior y captación Chimu del Lago Titicaca.

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1. LAGO TITICACA

El lago Titicaca se encuentra a una altitud de 3 810 msnm y un área de 903 km² de agua, es reconocido como sitio Ramsar (Humedales de Importancia Internacional). El Lago Mayor o Chucuito tiene un área de 6 450 km²; el Lago Menor o Wiñay Marka con 2 112 km². La bahía Puno es parte del Lago Mayor su área es 589 km² y profundidad máxima de 30 m. La bahía de Puno muestra muy poco flujo y gran incremento de lenteja de agua, la cual limita la oxigenación del agua y es susceptible a problemas bastante serios de contaminación. Sus características climáticas son bruscas, la naturaleza ecológica del lago le da un equilibrio y soporte ambiental, ya que, regula el bienestar de las poblaciones, Su temperatura oscila 14°C a 9 °C y de manera ambiental entre 15.3 °C y 1.5 °C, humedad entre 65 a 50% y con un PH alcalino (15–17).

1.1.1. Bahía interior

El Lago Titicaca está definido por tres zonas: i) el Lago Grande, el cual es de mayor envergadura con aproximadamente 6,000 Km², ii) el Lago Pequeño con un área de 1,250 Km², por último, iii) la Bahía de Puno con una extensión de 525 Km². Además de estas tres zonas, existe una extensión del Lago determinada como Bahía Interior, la cual está presente de manera colindante con la ciudad de Puno y posee un área de solo 16 Km² (18).

Esta pequeña zona tiene también una profundidad menos a 3 m. Entre sus características está la presencia de poca retención; adicionalmente, es la zona donde se presenta el mayor flujo de contaminantes provenientes de las aguas servidas de la ciudad de Puno. También presenta un alto contacto antropogénico debido a las actividades de pesca, obtención de totora, el turismo en lanchas, ganadería y comercio (19).

1.1.2. Captación Chimu

Fuente de captación de agua ubicada en el sector Chimu, abastece al 95% de la población de la ciudad de Puno, el otro 5% es parte de las captaciones Totorani y Aracmayo. Posee dos tomas de succión que se conectan con la desembocadura del río Huile. El agua obtenida por dicha captación se dirige a la planta de tratamiento

Aziruni donde se realizan diversas pruebas tanto fisicoquímicas como microbiológicas (20).

1.1.3. Contaminación del Lago Titicaca

Uno de los principales problemas de contaminación en el lago Titicaca es la descarga de aguas residuales y desechos industriales sin tratar, debido a las actividades de poblaciones cercanas al lago, como la ciudad de Puno, que carece de un sistema de tratamiento adecuado, lo que resulta en la liberación directa de aguas residuales sin tratar al lago, las cuales contienen una variedad de contaminantes, como bacterias, nutrientes en exceso (como nitrógeno y fósforo) y productos químicos tóxicos, que afectan negativamente la calidad del agua y la vida acuática (16).

Así mismo en dichas aguas se tiene componentes de contaminantes emergentes, como es el caso de los antibióticos, los cuales son utilizados por la población de la ciudad de Puno y alrededores, los cuales por su naturaleza no son metabolizados completamente y una buena parte de los mismos llegan al medio acuático, también en el hospital Manuel Núñez Butrón, Las aguas residuales son vertidas sin tratamiento en la bahía interior del lago Titicaca (21).

Las consecuencias, son básicamente la pérdida de la calidad del agua, específicamente un proceso de eutrofización, con niveles elevados de nutrientes como el nitrógeno y fósforo, lo cual genera un proceso de anoxia y por tanto limitando el desarrollo de organismos que requieren oxígeno para su supervivencia, así mismo otra consecuencia de importancia y que aún no se ha estudiado a profundidad, es la generación de genes de resistencia frente a los antibióticos, esto debido a que en las aguas de la bahía interior, se ha formado biomas específicos con poblaciones bacterianas con multiresistencia, convirtiéndose en focos infecciones y constituyéndose en un problema de salud pública (21).

1.1.4. Microbioma del Lago Titicaca

El Lago Titicaca alberga una gran diversidad, como bacterias, arqueas, hongos y virus presentes en el agua, el sedimento y otros hábitats. Estos microbiomas son importantes para funcionamiento y la salud del ecosistema acuático (16).

Los microorganismos del Lago Titicaca; participan en numerosos procesos biogeoquímicos, descomposición de la materia orgánica, la ciclización de nutrientes y la producción de gases. Por ejemplo, las bacterias y las arqueas juegan un papel

importante en el ciclo del nitrógeno, transformando compuestos nitrogenados en diferentes formas a medida que se mueven a través del ambiente acuático (22).

Los microbiomas del Lago están involucrados en la degradación y metabolización de contaminantes. Algunas bacterias pueden degradar compuestos orgánicos tóxicos, como hidrocarburos, pesticidas y productos químicos industriales, contribuyendo a la descontaminación natural de las aguas del lago (23).

Aunque no se han estudiado las estructuras de los bios del lago Titicaca, hay varias familias de bacterias que las forman:

Proteobacteria: Esta es una de las principales familias bacterianas del lago Titicaca. Se encuentran diferentes géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Escherichia coli* (22).

Actinobacteria: Esta familia bacteriana incluye una amplia variedad de géneros, como *Arthrobacter*, *Micrococcus* y *Streptomyces*. Estas bacterias son conocidas por su capacidad para producir enzimas y compuestos bioactivos (16).

Bacteroidetes: Se ha detectado la presencia de bacterias pertenecientes a esta familia en el lago Titicaca, algunos géneros son *Flavobacterium* y *Chryseobacterium* (22).

Firmicutes: Esta familia bacteriana incluye bacterias Gram positivas, como *Bacillus* y *Clostridium*. Algunas especies de *Bacillus* poseen la capacidad de formar endosporas resistentes, que les permiten sobrevivir en condiciones ambientales adversas (16).

Cyanobacteria: Las cianobacterias, también conocidas como algas verde-azuladas, son responsables de la producir cianotoxinas y de crear floraciones algales en el lago Titicaca. Hay algunos géneros de cianobacterias llamados *Microcystis*, *Oscillatoria* y *Anabaena* (16,22,23).

1.2. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG)

Luego del descubrimiento de los antibióticos no se tenía claro el concepto de resistencia a los antibióticos. Entre los motivos estaba lo poco probable que era las mutaciones en bacterias para volverse resistentes. No obstante, las bacterias han reaccionado frente a los ataques químicos provenientes de los antibióticos a través de diversos mecanismos. No se logró prevenir en su momento la facultad de las bacterias al intercambiar genes.

Conocido como la transferencia horizontal de genes (HGT). Determinando los que sería los genes de resistencia a antibióticos, lo cual empezó junto al descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina (24,25).

Los ARG se han producido en la naturaleza desde hace cientos de millones de años. Diversos estudios han reportado la presencia de ARG para β -lactámicos, tetraciclinas, vancomicina en zonas medulares de sedimentos congelados con treinta mil años de antigüedad. Se clasifica a los ARG como resistencia intrínseca o adquirida (mediante HGT). Por último, el término resistoma se determina a todos los ARG en una comunidad de bacterias (26–29).

La existencia de ARG en microbiomas es un tema muy preocupante en salud pública en el mundo. Diversos ambientes se encuentran amenazados debido al uso en gran escala de antibióticos y como los resistomas van evolucionando en el tiempo. Además, de la capacidad de los ARG de acumularse tanto en agua, suelo y aire (30).

1.3. EXTRACCIÓN DE ADN EN MICROBIOMAS

Es una metodología que permite aislar ADN por medio de métodos químicos y físicos a partir de una muestra. Se purifica el ADN de las membranas de las células, pared celular, lípidos, proteínas, entre otras moléculas pertenecientes de la célula. Friedrich Miescher extrajo ADN por primera vez en 1869 (31).

La extracción de ADN es un paso relevante en la caracterización de la diversidad microbiana, tanto en muestras de lagos, cuerpo humano, entre otros. Se considera entonces un gran desafío el extraer ADN el cual sea en cantidad y calidad representativa de lo presente en microbiomas (32).

La selección de un protocolo idóneo para la extracción de ADN en metagenomas no ha sido relevante en diversas investigaciones. Por ello, un gran número de estudios sobre microbiomas utilizan protocolos de extracción de ADN sin una justificación y validación relevante (33).

Diversos autores han tratado de mejorar el rendimiento en la extracción del ADN en microbiomas por medio de protocolos con alteraciones físicas, por ejemplo, con el batido de perlas y la sonicación lo cual permite una mejor lisis de las bacterias. Una contraparte de dichos métodos son la lisis del ADN genómico en fragmentos diminutos, lo cual puede

generar ruido en la amplificación por PCR o secuenciamiento (34).

1.3.1. Concentración del ADN

La estimación precisa en la concentración de ADN es relevante en pruebas de secuenciamiento. Los métodos de cuantificación son del tipo indirectas. Siendo el método de espectrofotometría el más común que identifica tanto ADN y ARN a una absorbancia de 260 nm. En el mercado se encuentran diversos equipos para la realización de esta metodología. Algunos de ellos requieren el uso de celdas o cubetas, así como otros equipos requieren solo microvolúmenes de ADN. Referente a las cubetas, el paso de 1 cm en la absorbancia representa 50 ng/ μ l de concentración (35).

Se realizó la comparación del protocolo de cuantificación de la concentración de ADN por espectrofotometría a través de dos métodos de medida de la concentración fluorométricas: prueba de PicoGreen y la prueba de cuantificación de ADN genómico en tiempo real. Se obtuvo como resultados que es el método por espectrofotometría el cual se correlaciona con los datos teóricos (36).

1.3.2. Calidad del ADN

La metodología más usada para obtener el grado de pureza del ADN aislado es a través de la absorbancia. Dicho método requiere, del mismo modo que la cuantificación, el uso de un espectrofotómetro. La absorbancia se dará a una longitud de 260 nm; no obstante, en la muestra no solo el ADN absorbe a 260 nm, del mismo modo el ARN presenta una absorbancia mayoritaria a la misma longitud de onda. Asimismo, las proteínas, gracias a la presencia de aminoácidos aromáticos absorben en el espectrofotómetro a una longitud de 280 nm. Tanto el ARN como las proteínas son moléculas contaminantes en las muestras de ADN aislado. Por este motivo, la calidad del ADN se obtiene con la división de la absorbancia a 260 nm con la obtenida a 280 nm. Resultados con valores de 1.6 a 2.0 representan ADN de buena calidad. Del mismo modo, resultados menores a 1.6 no confirma la presencia de ADN óptimo para pruebas de PCR o secuenciamiento debido a la presencia de diversos contaminantes (37).

1.3.3. Integridad del ADN

Para obtener el perfil de calidad del ADN, se debe realizar la prueba de electroforesis en geles de agarosa para el ADN extraído. Y su uso requiere obtener previamente la

concentración de ADN para determinar con precisión el peso de ADN que se aplicará en cada pocillo del gel de agarosa.

La evaluación de la integridad se ha estandarizado en concentraciones de 200 ng de ADN, en geles de agarosa al 0.5 %, y corriendo a 100 mV, 200 mA por 45 minutos. Por medio de esta metodología es posible observar si la muestra es ADN íntegro o fragmentado. El primero se detecta como una banda compacta, el segundo, como un frotis en el gel (38).

1.3.4. Secuenciamiento por Shotgun

Es una secuenciación no dirigida de todos los metagenomas bacterianos presentes en una muestra. El secuenciamiento por Shotgun permite realizar perfiles taxonómicos, el potencial funcional de los microbiomas, recuperar secuencias completas del genoma, entre otros. Además, permite el análisis de funciones específicas de interés como la determinación de ARG en microbiomas por medio de bases de datos, lo cual requiere de conceptos informáticos complejos para su respectivo análisis (39).

La metodología de secuenciamiento que utiliza zonas específicas amplificadas, normalmente están dirigidas a un solo gen o región del genoma. Por otro lado, el secuenciamiento por Shotgun es una prueba aleatoria de secuenciamiento, que al no presentar primers específicos, disminuye el ruido que representa la elección de primers (14).

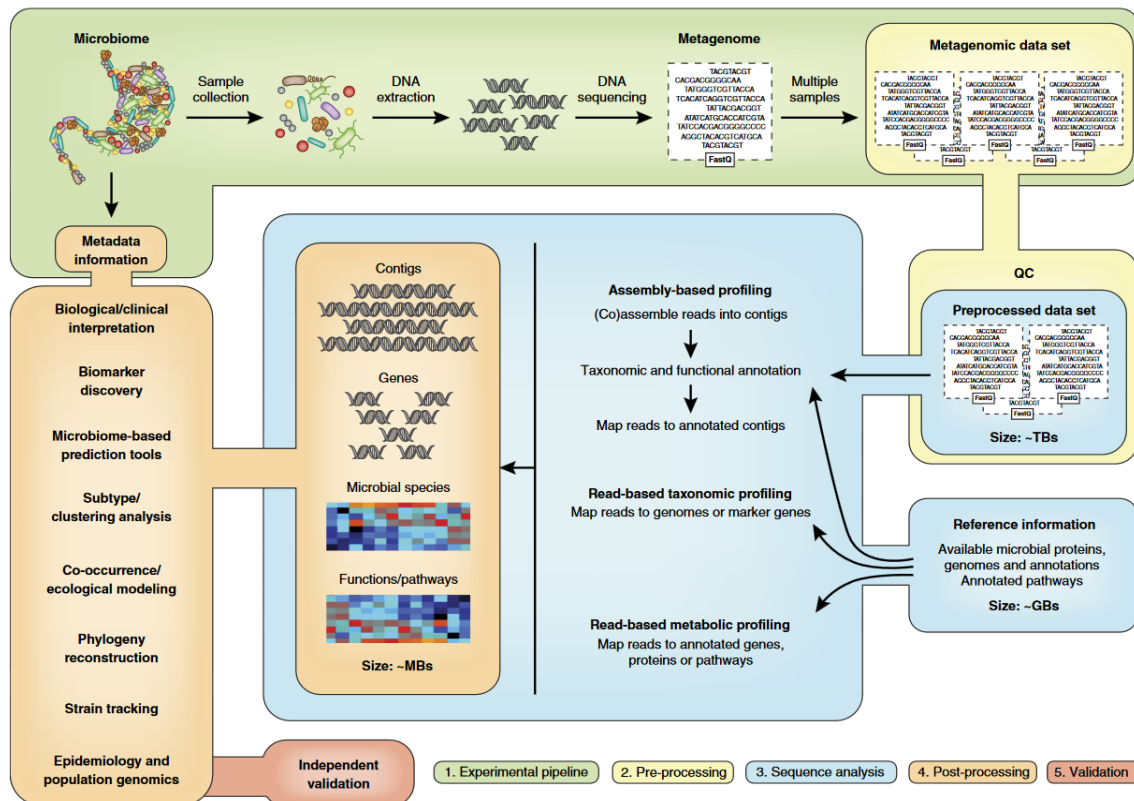


Figura 01: Flujo de trabajo para el secuenciamiento por Shotgun (14).

1.3.5. Análisis de metagenomas por Galaxy

Galaxy combina el poder de las bases de datos de anotaciones genómicas existentes con un portal web simple para permitir a los usuarios buscar recursos remotos, combinar datos de consultas independientes y visualizar los resultados. El corazón de Galaxy es un sistema de historial flexible que almacena las consultas de cada usuario; realiza operaciones como intersecciones, uniones y restas; y enlaces a otras herramientas computacionales (40).

1.3.6. Base de datos CARD

La base de datos integral sobre resistencia a los antibióticos (CARD), inicialmente en línea en 2015 y ampliada en 2016, CARD ahora tiene más de 2500 entradas ARG con una actualización mensual. Cada entrada representa un tipo de ARG. Estas entradas se colocan en una estructura jerárquica de términos de ontología genética. Para cada entrada, CARD proporciona secuencias representativas de ADN y proteínas y un umbral de puntuación de bits para informar los aciertos de ARG mediante la alineación BLAST. Además, CARD recopila más de 140.000 secuencias del NCBI y las clasifica para generar datos de prevalencia de los tipos de ARG en el medio ambiente (41).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

Los puntos de recolección de muestra fueron i) en la Bahía Interior de Puno, Perú. Situado en las coordenadas (15°50'09"S 70°00'46"W) Figura N°02. y ii) en la Captación Chimú de Puno, Perú, situado en las coordenadas (15°51'03"S 69°57'41"W) Figura N°03.

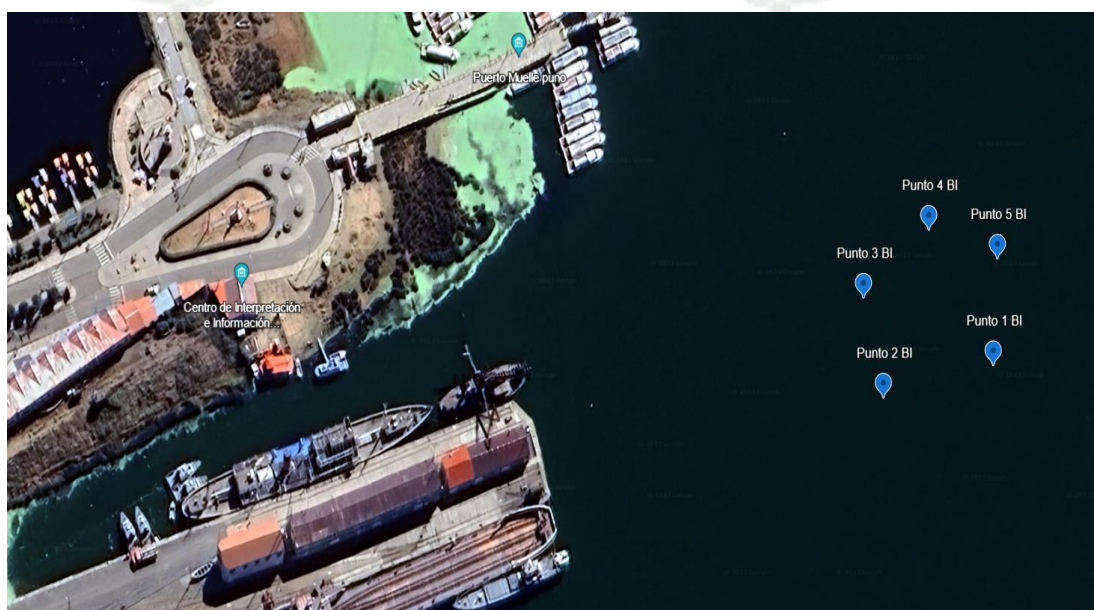


Figura 02: Punto de muestreo en la Bahía Interior de Puno, Perú (Google Earth)

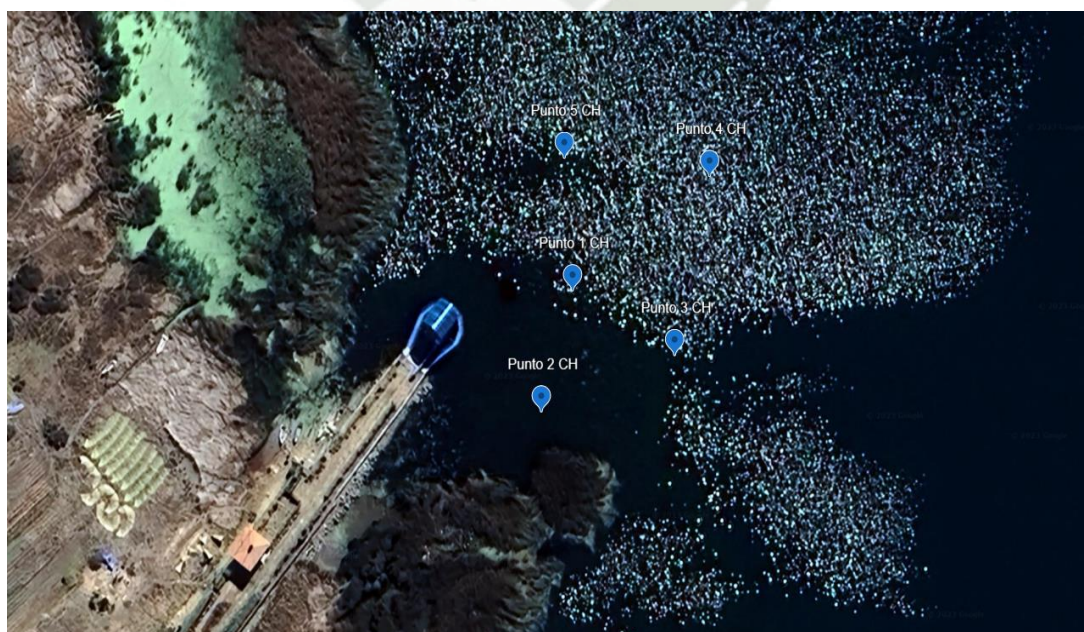


Figura 03: Punto de muestreo en la Captación Chimú de Puno, Perú (Google Earth)

2.1.1. Recolección de las muestras de agua

La recolección de muestras tanto en la bahía interior como en la Captación Chimu fue bajo las directrices del Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (42).

Se recolectaron 2 litros de muestras de agua de la Bahía Interior y la Captación Chimu del Lago Titicaca utilizando bidones esterilizados con luz UV, en cinco puntos de muestreo separados por una distancia de 25 metros, Figura N°04. Los puntos fueron registrados en proyectos de Google Earth.

Seguidamente, se mezcló y homogenizó las muestras recolectadas en los 5 puntos de Bahía Interior, Tabla N°01; de igual manera se realizó con las muestras de agua obtenidas en los 5 puntos de muestreo de la captación Chimu, Tabla N°02.

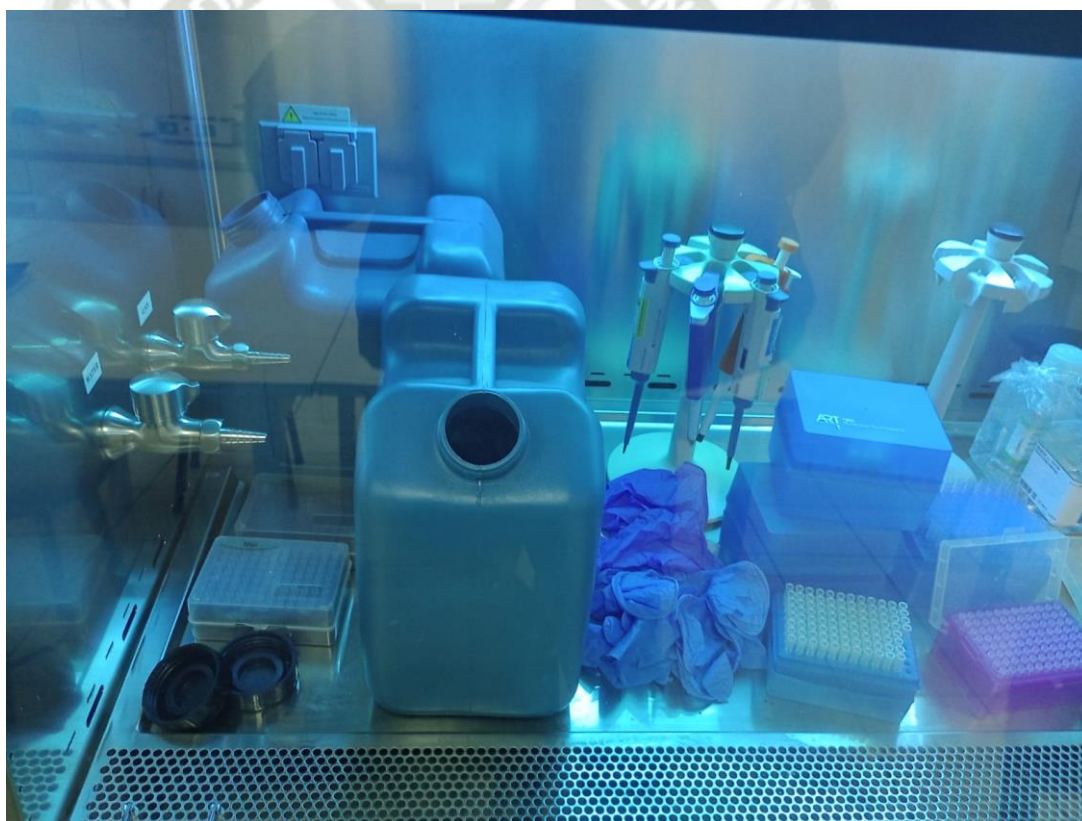


Figura 04: Esterilización por UV de bidones para la toma de muestras de agua
(Laboratorio de Biología Molecular – UNA -Puno)

Tabla 01: Coordenadas de los Puntos de Muestreo de la Bahía Interior.

Muestras de la Bahía Interior		
Punto	S	W
1	15°50'09"	70°00'46"
2	15°50'09"	70°00'47"
3	15°50'08"	70°00'48"
4	15°50'07"	70°00'47"
5	15°50'08"	70°00'46"

Se presentan las coordenadas de cinco puntos de muestreo en la Bahía Interior, especificando la latitud y longitud de cada uno.

Tabla 02: Coordenadas de los Puntos de Muestreo de la Captación Chimú.

Muestras de la Captación Chimú		
Punto	S	W
1	15°51'03"	69°57'41"
2	15°51'04"	69°57'42"
3	15°51'04"	69°57'40"
4	15°51'04"	69°57'40"
5	15°51'02"	69°57'41"

A continuación, se presentan las coordenadas de cinco puntos de muestreo ubicados en la Captación Chimú, detallando la latitud y longitud.

2.1.2. Filtración de muestras

La muestra líquida obtenida de la bahía interior y la captación Chimú se filtró en una membrana de 0.2 μm (Whatman Nucleopore – Sigma Aldrich) a través de un embudo de filtro desechable (Pall MicroFunnel – Thermo Fisher Scientific). Se conectó a un colector de vacío, donde se vertió 100 ml de las muestras en el embudo y a través de una bomba de vacío se inició a la filtración, Figura N°05. Al observar que filtros están secos, se desconectó la bomba de vacío y se retiró el embudo con precaución de no lastimar las membranas de 0.2 μm .

Por medio de dos pinzas debidamente esterilizadas en etanol, se dobló los filtros por

la mitad, luego se doblará el filtro dos veces nuevamente; finalmente, se colocó un tubo precargado con perlas de vidrio y se almacenó las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 05: Sistema de filtración para muestras de agua (Laboratorio de Biología Molecular – UNA -Puno)

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE AGUA FILTRADAS

El ADN se purificó utilizando el kit comercial Purelink (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, Anexo N°01.

Para la preparación del lisado. Primero, se centrifugó la muestra a $14,000 \times g$ por 10 minutos. Esto permitió obtener a los microorganismos en el pellet. Seguidamente, se desechó con cuidado el sobrenadante. Se suspendió el pellet con microorganismos en $800\ \mu\text{l}$ del buffer de lisis, y se homogenizó usando el mezclador vortex.

Seguido ello, se transfirió la muestra en el Tubo Bead. Se agregó $100\ \mu\text{l}$ de Mejorador de Lisis y se mezcló por medio de vortex. Se centrifugó a $14,000 \times g$ por 2 minutos. Se transfirió $500\ \mu\text{l}$ del sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio.

Respecto a la unión del ADN con la columna. Se agregó $900\ \mu\text{l}$ del buffer de unión y se homogenizó con vortex brevemente. Luego, se cargó $700\ \mu\text{l}$ de la mezcla de la muestra

a un tubo con columna y se centrifugó a 14,000 x g por 1 minuto. Se descartó la parte líquida.

Para el lavado y elución del ADN se colocó la columna en un tubo colector limpio, se agregó 500 µl de buffer de lavado, luego se centrifugó a 14,000 x g por 1 minuto. Se desechó la parte líquida presente, de inmediato, se centrifugó la columna y el tubo colector a 14,000 x g por 30 segundos.

Se volvió a colocar la columna en un tubo limpio y se agregó 100 µl de buffer de elución, posteriormente, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. El tubo con la columna fue centrifugado a 14,000 x g durante 1 minuto; posteriormente, se retiró la columna, quedando el ADN purificado en el tubo de recolección. Finalmente, se almacenó el ADN extraído a -80 °C.

2.2.1. Concentración del ADN

Se llevó a cabo a través de un espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max) utilizando por lectura 1 µl de muestra de ADN. La muestra se blanqueó con los Buffers de Elución kit de purificación Purelink – Thermo Fisher Scientific. Los resultados se obtuvieron con la unidad de concentración de ng/µl.

2.2.2. Calidad del ADN

De igual manera se procedió por el espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max). Se blanqueó la muestra kit de purificación Purelink – Thermo Fisher Scientific. Y se utilizó 1 µl de muestra de ADN. Se evaluó la razón entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm siguiendo la fórmula:

$$\text{Calidad ADN} = \frac{\text{Absorbancia 260 nm}}{\text{Absorbancia 280 nm}}$$

Los resultados alrededor a 1.8 indican ADN de buena calidad, mientras que los valores más bajos indican contaminación por proteínas debido a que las proteínas poseen un pico de absorción a 280 nm debido a los aminoácidos aromáticos. Los valores más altos indican contaminación por ARN (43).

2.2.3. Integridad del ADN

La integridad de ADN extraído se determinó por medio de electroforesis de geles de agarosa a concentración del 1%. Se utilizó 0.5 g de agarosa en 49 ml de agua destilada y 1 ml de Buffer TAE (Tris Acetatos EDTA) a concentración 50x. Se calentó la solución hasta el punto de ebullición y se vertió en una cámara electroforética tipo

horizontal equipada con el peine y bloques respectivos. Se dejó enfriar por 30 minutos. Seguido de ello, se llenó la cámara electroforética con buffer de corrida TAE a concentración 1x. Finalmente, se cargó 20 ng de ADN extraído tanto de las muestras de la bahía interior y de la captación Chimú. Las muestras se corrieron en el gel a 100V por 25 minutos para luego de ello ser evaluada las bandas a través del transiluminador marca Life Technologies, E-gel Imager para determinar la integridad del ADN.

2.3. SECUENCIAMIENTO DEL ADN EXTRAÍDO

El ADN extraído de las muestras ambientales de la Bahía Interior y la Captación Chimú del Lago Titicaca fue enviado a un laboratorio especializado en Estados Unidos para su secuenciamiento mediante la tecnología metagenómica shotgun, utilizando una estrategia de lectura pareada (PE) con una longitud de 2x150 pares de bases (pb) y una profundidad de 10 millones de lecturas por muestra, distribuidas equitativamente en ambas direcciones (5 millones de lecturas por dirección).

El proceso de secuenciación metagenómica mediante la tecnología shotgun se llevó a cabo en tres etapas fundamentales: preparación de la biblioteca, secuenciación y análisis de datos. La primera etapa consistió en la fragmentación aleatoria del ADN extraído para generar fragmentos de tamaño adecuado, seguidos por la ligación de adaptadores específicos en los extremos 5' y 3' de los fragmentos de ADN. Estos adaptadores permiten la fijación eficiente al sustrato del secuenciador y facilitan la identificación de cada fragmento durante la secuenciación. Posteriormente, la biblioteca preparada fue sometida a secuenciación de alto rendimiento mediante plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS), que permiten la obtención de grandes volúmenes de datos con alta precisión y resolución.

Para optimizar la eficiencia del proceso y maximizar la cobertura del resistoma microbiano presente en las muestras, se utilizó la multiplexación de muestras, permitiendo la secuenciación simultánea de múltiples muestras en una única corrida. Este enfoque permitió el análisis de miles de organismos en paralelo, asegurando una representación amplia y detallada de la diversidad microbiana y sus genes de resistencia a antibióticos en los entornos estudiados.

2.3.1. Análisis bioinformático.

El análisis bioinformático de los metagenomas se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA) – Puno, utilizando herramientas computacionales ejecutadas a través de la línea de comandos en una arquitectura Unix, lo que permitió un procesamiento eficiente y reproducible de los datos. La evaluación de la calidad de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la plataforma en línea Galaxy (www.usegalaxy.org), la cual proporciona una interfaz accesible y herramientas robustas para el control de calidad y preprocesamiento de datos metagenómicos (40). El ensamblado de los genes se realizó utilizando el programa MEGAHIT, una herramienta optimizada para el ensamblaje de secuencias de alto rendimiento, permitiendo la reconstrucción de contigs a partir de las lecturas obtenidas (44). Posteriormente, la identificación de los genes de resistencia a antibióticos (ARG) se llevó a cabo utilizando la base de datos Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) en su versión 3.2.6, reconocida por su amplia colección de determinantes de resistencia a antibióticos microbianos, garantizando una identificación precisa y fiable de los ARG presentes en las muestras analizadas (45).

2.3.2. Variables e Indicadores.

Se presentan las posibles variables e indicadores que se pueden extraer de la investigación relacionado con la identificación metagenómica de genes resistentes a antibióticos en el Lago Titicaca y la Captación Chimú.

Variables	Indicadores
Calidad del ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Relación A260/A280 (pureza del ADN). • Concentración de ADN (ng/μl). • Integridad del ADN (evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa).
Abundancia de Genes de Resistencia a Antibióticos (ARG)	<ul style="list-style-type: none"> • Número total de ARG identificados en cada muestra (Bahía Interior y Captación Chimú). • Porcentaje de cobertura de cada ARG (ej. vanYB, dfrB1, catV, etc.). • Comparación de la abundancia de ARG entre las dos localidades.
Diversidad Microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Número de diferentes especies bacterianas identificadas en las muestras. • Diversidad genética (medida a través de la secuenciación metagenómica).
Contaminación del Agua	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de contaminantes (ej. residuos de antibióticos, nutrientes en exceso). • Evaluación de la calidad del agua (parámetros fisicoquímicos como pH, turbidez, etc.).
Impacto en la Salud Pública	<ul style="list-style-type: none"> • Incidencia de infecciones resistentes en la población local. • Necesidad de monitoreo continuo de la calidad del agua y resistencia a antibióticos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DEL ADN EXTRAÍDO

3.1.1. Concentración del ADN extraído en la Bahía Interior y la Captación Chimú

La concentración de ADN extraído de las muestras provenientes de la Bahía Interior y la Captación Chimú, como se presenta en las Tablas N°03 y N°04, fue óptima para su posterior secuenciamiento. La optimización del proceso de extracción se logró mediante el uso de un kit especializado para metagenomas, diseñado específicamente para maximizar la recuperación de ADN a partir de consorcios bacterianos, lo que asegura una alta eficiencia en la obtención del material genético.

Tabla 03: Resultados de la concentración de ADN en la Bahía Interior.

Concentración de ADN (ng/μl)	Bahía Interior
Lectura 1	39.415
Lectura 2	44.781
Lectura 3	36.487
Lectura 4	40.935
Valor Final	41.512

El valor final de la concentración de ADN en la Bahía Interior fue de **41.512 ng/μl**, lo que indica una recuperación adecuada del material genético, óptima para su posterior secuenciamiento.

Tabla 04: Resultados de la concentración de ADN en la Captación Chimú.

Concentración de ADN (ng/ μ l)	Captación Chimú
Lectura 1	21.741
Lectura 2	22.973
Lectura 3	22.012
Lectura 4	21.412
Valor Final	22.321

El valor final de la concentración de ADN en la Captación Chimú fue de **22.321 ng/ μ l**, lo que sugiere una recuperación moderada del material genético, adecuada para el análisis posterior.

3.1.2. Calidad del ADN extraído en la Bahía Interior y la Captación Chimú

Los resultados sobre la calidad del ADN extraído, presentados en las Tablas N°05 y N°06, indican que el material genético obtenido de los consorcios bacterianos de la Bahía Interior y la Captación Chimú es de alta calidad, manteniendo su integridad estructural. Estos valores confirman que el ADN extraído es adecuado para su posterior análisis, asegurando la fiabilidad de los resultados obtenidos en el proceso de secuenciamiento.

La Tabla N°05 presenta los resultados de la calidad del ADN extraído de las muestras de la Bahía Interior. Se realizaron cuatro lecturas, obteniendo los siguientes valores:

Tabla 05: Resultados de la calidad de ADN en la Bahía Interior.

Calidad de ADN	Bahía Interior
Lectura 1	1.692
Lectura 2	1.751
Lectura 3	1.702
Lectura 4	1.732
Valor Final	1.724

El valor final de la calidad del ADN en la Bahía Interior fue de **1.724**, lo que indica que el material genético obtenido mantiene una alta calidad y su integridad estructural, siendo adecuado para su posterior análisis y secuenciamiento.

La Tabla 06 muestra los resultados de la calidad del ADN extraído de las muestras de la Captación Chimu. Se realizaron también cuatro lecturas, con los siguientes valores:

Tabla 06: Resultados de la calidad de ADN en la Captación Chimu.

Calidad de ADN	Captación Chimu
Lectura 1	1.701
Lectura 2	1.643
Lectura 3	1.632
Lectura 4	1.631
Valor Final	1.671

El valor final de la calidad del ADN en la Captación Chimu fue de **1.671**, lo que sugiere que el material genético obtenido es de buena calidad y mantiene su

integridad, lo que garantiza la fiabilidad de los resultados en el análisis posterior.

3.1.3. Integridad del ADN en la Bahía Interior y la Captación Chimu

La integridad del ADN extraído de las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, cuyos resultados se presentan en la Figura N°06. Los resultados revelan la presencia de bandas definidas y concisas en las muestras con una carga de 20 ng de ADN, lo que indica una adecuada conservación de la estructura del material genético. En la evaluación del ADN total, donde se alicuotaron 10 μ l del ADN extraído, las bandas observadas fueron aún más nítidas e intensas, reflejando un alto grado de integridad del ADN. La ausencia de fragmentación o señales de degradación, evidenciada por la falta de manchas o smearing en la electroforesis, confirma la calidad del ADN obtenido tanto de la Bahía Interior (BI) como de la Captación Chimu (CH), asegurando su idoneidad para posteriores análisis moleculares.

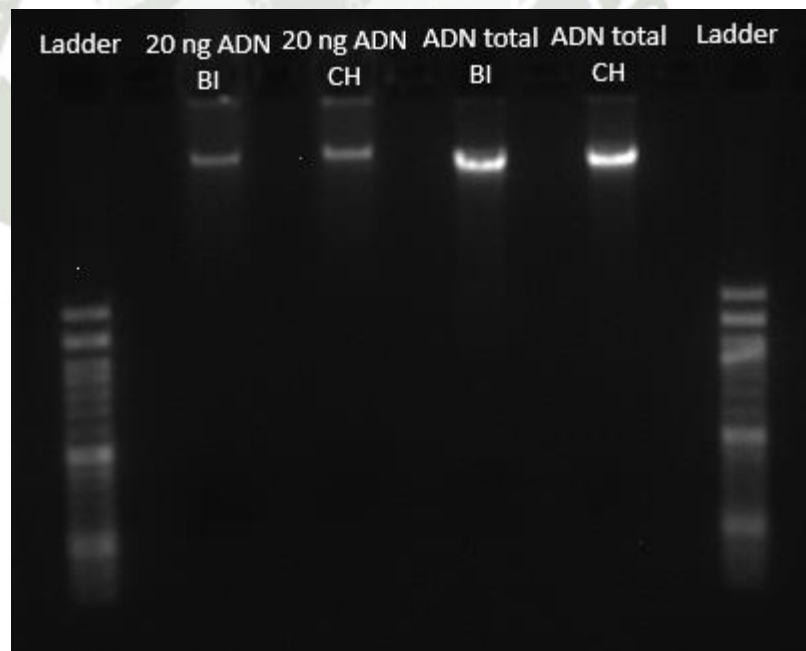


Figura 06: Resultado de Integridad del ADN en la Bahía Interior y la Captación Chimu
(Laboratorio de Biología Molecular – UNA Puno)

3.1.4. Resultados del Análisis Bioinformático de Metagenomas de Consorcios Bacterianos del Lago Titicaca

El análisis bioinformático de los metagenomas de consorcios bacterianos de la Bahía Interior y la Captación Chimu del Lago Titicaca ha revelado información crucial

sobre la diversidad y abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARG). Se utilizó la herramienta FastQC para el control de calidad de las secuencias obtenidas mediante secuenciación shotgun, lo que permitió filtrar lecturas de baja calidad y asegurar la fiabilidad de los datos. Posteriormente, las lecturas filtradas fueron ensambladas en contigs utilizando el programa MEGAHIT, generando un total de contigs que reflejan la diversidad genética de las comunidades bacterianas en ambas muestras.

Tabla 07: Resultados de análisis bioinformático de metagenomas de Consorcio Bacterianos en la Bahía Interior y Captación Chimú.

Sección	Descripción
1. Control de Calidad de Secuencias	Evaluación Inicial: Se utilizó Fast QC para evaluar la calidad de las lecturas. La mayoría mostró puntuaciones aceptables, con un porcentaje significativo de alta calidad. - Filtrado de Lecturas: Se eliminaron lecturas de baja calidad para asegurar datos confiables.
2. Ensamblaje de Secuencias	Uso de MEGAHIT: Las lecturas filtradas fueron ensambladas en contigs, generando un total que representa la diversidad genética de las comunidades bacterianas en ambas muestras.
3. Identificación de ARG	Base de Datos CARD: Se identificaron 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimú.
4. Resultados Específicos de ARG	Bahía Interior: vanYB: 30.86% de cobertura dfrB1: 8.86% de cobertura catV: 7.27% de cobertura Ecol_emrE: 6.31% de cobertura Captación Chimú: vanYB: 42.75% de cobertura vanWI: 20.59% de cobertura evgA: 4.39% de cobertura OXA-726: 3.4% de cobertura
5. Análisis Comparativo de Abundancia de ARG	La Captación Chimú mostró mayor abundancia de genes de resistencia, sugiriendo mayor presión selectiva, posiblemente por su uso como fuente de agua potable y actividades humanas.
6. Implicaciones de los Resultados	Salud Pública: La identificación de ARG en agua potable resalta la necesidad de monitorear la calidad del agua y la resistencia a antibióticos. Biodiversidad Microbiana: Las comunidades bacterianas están expuestas a presión selectiva, afectando la biodiversidad y dinámica de ecosistemas acuáticos.
7. Conclusiones Generales	El análisis ha proporcionado información valiosa sobre la diversidad y abundancia de ARG, subrayando la importancia de implementar estrategias de monitoreo y control para mitigar la resistencia antimicrobiana.

3.2. EVALUACIÓN DEL ADN SECUENCIADO EN LA BAHÍA INTERIOR Y LA CAPTACIÓN CHIMU

El análisis de calidad de las secuencias obtenidas se realizó utilizando la plataforma en línea Galaxy (www.usegalaxy.org), empleando la versión Galaxy 0.74+galaxy0. Para evaluar la calidad de los datos de secuenciamiento de las muestras provenientes de la Bahía Interior y la Captación Chimu, se utilizó la herramienta Fast QC, la cual generó informes detallados sobre la calidad de cada lectura secuenciada. Esta evaluación permitió identificar posibles problemas relacionados con la longitud de las secuencias, la distribución de la calidad a lo largo de las lecturas, la presencia de adaptadores y otros parámetros críticos para asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos.

3.2.1. Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado

Los datos estadísticos obtenidos ofrecen un resumen detallado de los parámetros clave del secuenciamiento, incluyendo el tipo de codificación, el número total de secuencias, la cantidad de bases nitrogenadas, el tamaño promedio de las secuencias y el porcentaje de contenido de guanina y citosina (GC%) para las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu, presentados en las Tablas N°08 y N°09, respectivamente. En la Bahía Interior se obtuvo un total de 5,643,902 secuencias, mientras que en la Captación Chimu se registraron 5,863,208 secuencias, evidenciando una cantidad de datos muy similar entre ambas muestras. Cabe destacar que ninguna de las secuencias obtenidas en ambas muestras ha sido etiquetada como de baja calidad, lo que indica un proceso de secuenciamiento de alto rendimiento y una calidad óptima de los datos generados. En cuanto al contenido de guanina y citosina (GC%), las muestras de ADN secuenciadas de la Bahía Interior presentan un porcentaje del 46%, mientras que las de la Captación Chimu alcanzan el 48%, mostrando una ligera diferencia en la composición de bases nitrogenadas entre ambas fuentes.

La Tabla N°08 presenta un resumen detallado de los parámetros clave del secuenciamiento para las muestras de la Bahía Interior. Los datos obtenidos son los siguientes:

Tabla 08: Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado en la Bahía Interior

Medida	Valor
Nombre	Bahía Interior
Tipo de archivo	FastQC
Codificación	Sanger / Illumina 1.9
Secuencias Totales	5,643,902
Bases Totales	852.2 Mbp
Secuencias etiquetadas como de baja calidad	0
Tamaño de las secuencias	151
%GC	46

Bahía Interior es un archivo de tipo FastQC, utilizado para evaluar la calidad de las secuencias. La codificación empleada es Sanger / Illumina 1.9, un estándar en la secuenciación de ADN. Se registraron un total de 5,643,902 secuencias, lo que indica una cantidad significativa de datos generados, y la cantidad total de bases nitrogenadas es de 852.2 Mbp, reflejando la extensión del material genético analizado. Se reporta un total de 0 secuencias etiquetadas como de baja calidad, lo que sugiere un proceso de secuenciamiento de alto rendimiento. El tamaño promedio de las secuencias es de 151 pares de bases, y el contenido de guanina y citosina (GC%) es del 46%, proporcionando información sobre la composición de las bases nitrogenadas en las muestras.

La Tabla N°09 muestra un resumen de los parámetros clave del secuenciamiento para las muestras de la Captación Chimú. Los datos obtenidos son los siguientes

Tabla 09: Datos estadísticos básicos del ADN secuenciado en la Captación Chimu

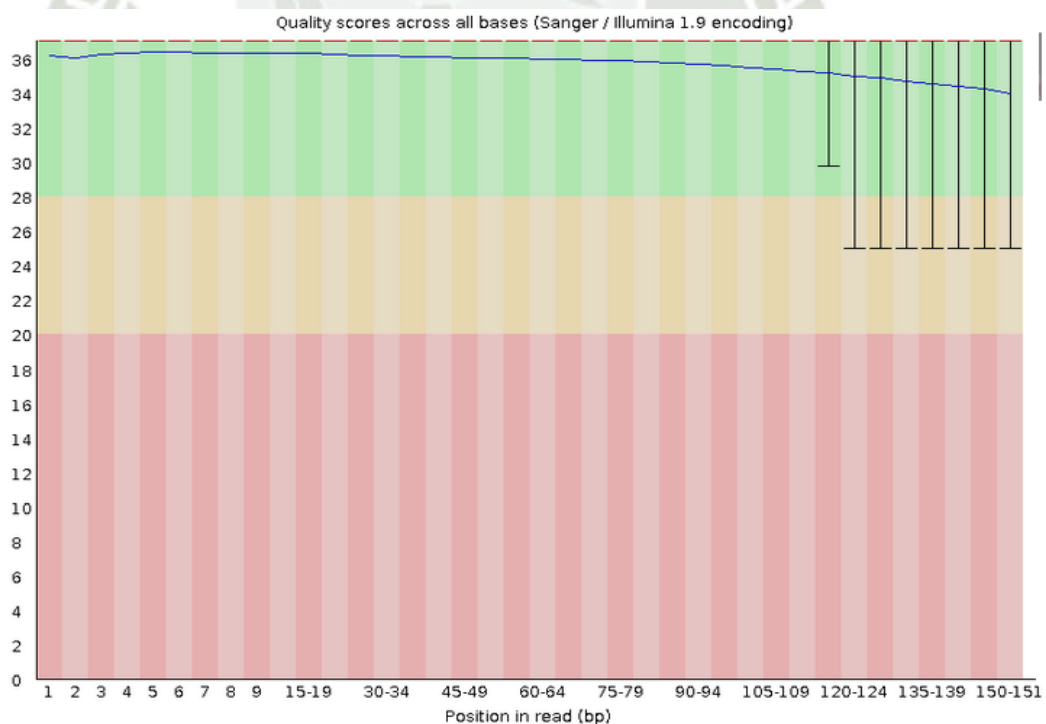
Medida	Valor
Nombre	Captación Chimu
Tipo de archivo	Llamados de base convencionales
Codificación	Sanger / Illumina 1.9
Secuencias Totales	5,863,208
Bases Totales	885.3 Mbp
Secuencias etiquetadas como de baja calidad	0
Tamaño de las secuencias	151
%GC	48

Captación Chimu es un archivo de llamados de base convencionales, utilizados para la interpretación de las secuencias. La codificación empleada es Sanger / Illumina 1.9, que asegura la calidad y precisión en el secuenciamiento. Se registraron un total de 5,863,208 secuencias, lo que indica una cantidad de datos muy similar a la obtenida en la Bahía Interior. La cantidad total de bases nitrogenadas es de 885.3 Mbps, reflejando una extensión considerable del material genético analizado. Se reporta un total de 0 secuencias etiquetadas como de baja calidad, lo que indica un proceso de secuenciamiento eficiente y de alta calidad. El tamaño promedio de las secuencias es de 151 pares de bases, igual que en la Bahía Interior, y el contenido de guanina y citosina (GC%) es del 48%, mostrando una ligera diferencia en la composición de bases nitrogenadas en comparación con la Bahía Interior.

3.2.2. Calidad del ADN secuenciado por secuencias de bases

Los resultados del análisis de calidad del ADN secuenciado se presentan en la Figura N°07 para la Bahía Interior y en la Figura N°08 para la Captación Chimu. En el caso

de la Bahía Interior, las secuencias presentan puntuaciones de alta calidad hasta la posición 120 de las lecturas. A partir de la posición 124 hasta la 151, se observan secuencias con puntuaciones de calidad media, las cuales corresponden a valores extremos que se encuentran fuera de los cuartiles y la mediana. No obstante, la mediana de los valores de calidad se ha mantenido consistentemente en la zona de alta calidad, indicando un secuenciamiento confiable. Es importante destacar que no se detectaron secuencias de baja calidad, lo que sugiere una adecuada preservación del material genético durante el proceso de secuenciamiento. Por otro lado, el ADN secuenciado de la Captación Chimú exhibe secuencias de alta calidad hasta la posición 105 de las lecturas. A partir de la posición 109 hasta la 151, se identifican secuencias con calidad media, consideradas valores extremos que se desvían de la mediana. Este comportamiento es esperado, ya que hacia el final de las lecturas es común observar una disminución de la calidad en algunas secuencias. Al igual que en la muestra de la Bahía Interior, no se detectaron secuencias de baja calidad, lo que indica un secuenciamiento de alto rendimiento y confiabilidad para el análisis posterior.



. **Figura 07:** Calidad por secuencia de bases del ADN secuenciado en la Bahía Interior
(usa Galaxy)

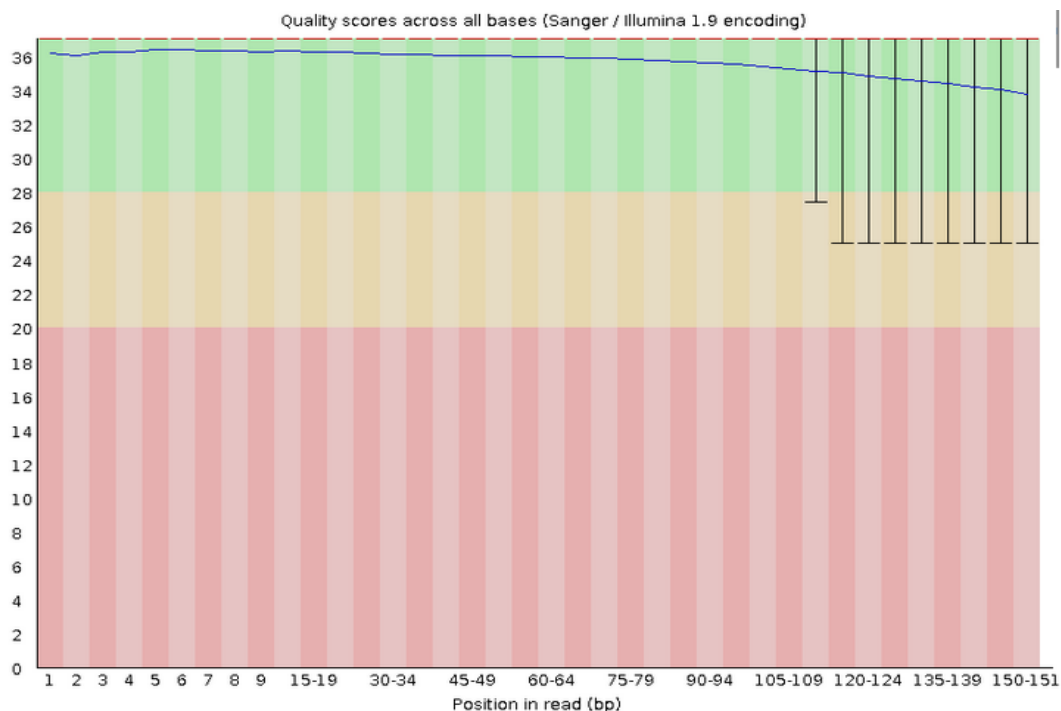


Figura 08: Calidad por secuencia de bases del ADN secuenciado en la Captación Chimu (usa Galaxy)

3.2.3. Resultados de la Evaluación de la Abundancia de ARG

La identificación de ARG se realizó a través de la Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), encontrando 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimu. Entre los genes más representativos, en la Bahía Interior se destacaron vanYB con 30.86% de cobertura, dfrB1 con 8.86%, catV con 7.27% y Ecol_emrE con 6.31%. En la Captación Chimu, vanYB alcanzó 42.75% de cobertura, seguido de vanWI con 20.59%, evgA con 4.39% y OXA-726 con 3.4%. La comparación entre sitios mostró que la Captación Chimu presenta una mayor abundancia de genes de resistencia, lo que sugiere una presión selectiva más intensa, posiblemente debido a su uso como fuente de agua potable y la influencia de actividades humanas.

Aunque el gen vanYB es predominante en ambas muestras, su cobertura es mayor en la Captación Chimu, que también mostró una mayor abundancia de ARG, posiblemente debido a la contaminación antropogénica y actividades agrícolas y acuícolas. Esta alta abundancia en la Captación Chimu representa un riesgo significativo para la salud pública, aumentando la posibilidad de infecciones resistentes. Se enfatiza la necesidad de implementar programas de monitoreo

continuo para evaluar la resistencia antimicrobiana y su impacto en la salud pública y el medio ambiente. En conclusión, los hallazgos subrayan la importancia de abordar la resistencia antimicrobiana como un problema crítico, promoviendo estrategias de gestión y control efectivas.

Tabla 10: Resultados de la Evaluación de Abundancia de ARG en la Bahía Interior y Captación Chimú.

Sección	Descripción
1. Identificación de ARG	Se identificaron 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimú, sugiriendo variaciones en la presión selectiva y condiciones ambientales.
2. Genes Más Representativos	<p>Bahía Interior:
 vanYB: 30.86% de cobertura
 dfrB1: 8.86% de cobertura
 catV: 7.27% de cobertura
</p> <p>Captación Chimú:
 vanYB: 42.75% de cobertura
 evgA: 4.39% de cobertura.</p>
3. Comparación de Abundancia	<p>La Captación Chimú mostró mayor abundancia de ARG, atribuible a contaminación antropogénica y actividades agrícolas/acuícolas.</p> <p>Riesgos para la Salud Pública: Alta abundancia de ARG puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes.
</p>
4. Implicaciones de los Resultados	<p>Necesidad de Monitoreo Continuo: Se requieren programas de monitoreo para evaluar la resistencia antimicrobiana.</p> <p>La evaluación ha proporcionado información valiosa sobre la diversidad y prevalencia de ARG, resaltando la necesidad de abordar la resistencia antimicrobiana como un problema de salud pública y ambiental.</p>
5. Conclusión	

Los genes más representativos en la Bahía Interior fueron vanYB (30.86% de cobertura), dfrB1 (8.86%) y catV (7.27%). En la Captación Chimú, destacaron vanYB (42.75%), evgA (4.39%), vanWI (20.59%) y OXA-726 (3.4%).

3.3. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS (ARG)

La identificación de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) se realizó utilizando la herramienta bioinformática AMR Pipeline, versión 1.3.2, en conjunto con la base de datos de referencia Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), versión 3.2.6. Los parámetros considerados en el análisis se detallan en la Tabla N°11, proporcionando un resumen de los criterios utilizados para la detección y caracterización de los ARGs presentes en las muestras analizadas (45).

Tabla 11: Resumen de los parámetros utilizados en el análisis con ARG Pipeline versión 1.3.2.

Muestra	Tipo de muestra	Lugar	Filtros pasados	Porcentaje	Reads totales
Bahía Interior	Agua de Lago	Lago Titicaca	1,229,193	21.78%	5,643,902
Captación Chimú	Agua de Lago	Lago Titicaca	1,221,291	20.83%	5,863,208

El análisis utilizando ARG Pipeline versión 1.3.2, cuyos parámetros se resumen a continuación. Para la muestra de Bahía Interior, el tipo de muestra fue agua de lago, ubicada en el Lago Titicaca, con 1,229,193 filtros pasados, un porcentaje de 21.78% y un total de 5,643,902 reads. En la muestra de Captación Chimú, también de agua de lago en el Lago Titicaca, se registraron 1,221,291 filtros pasados, un porcentaje de 20.83% y un total de 5,863,208 reads.

3.3.1. Genes de resistencia a antibióticos de la Bahía Interior

El análisis del resistoma de la Bahía Interior reveló la presencia de 28 genes de resistencia a antibióticos (ARGs), como se detalla en el Anexo N°02. Entre los ARGs identificados, aquellos con los valores de cobertura más elevados fueron vanYB (30.86%), dfrB1 (8.86%), catV (7.27%) y Ecol_emrE (6.31%), según los resultados presentados en la Tabla N°12. Estos hallazgos proporcionan una visión detallada de la diversidad y abundancia de los genes de resistencia presentes en la comunidad bacteriana de la Bahía Interior.

La Tabla 12 presenta los valores representativos de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) con mayor cobertura en la Bahía Interior. Se identificaron los

siguientes genes:

Tabla 12: Valores representativos de los cuadros ARG con mayor cobertura en la Bahía Interior.

Gen	Clase de fármaco	Mecanismo	Modelo	% Cobertura	% Identidad
vanYB	Antibiótico glicopéptido	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	30.86	50.56
dfxB1	Antibiótico diamino-pirimidina	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	8.86	100
catV	Antibiótico fenicol	Inactivación de antibióticos	Homólogo de proteína	7.27	100
Ecol_emrE	Antibiótico macrólido	Salida de antibióticos	Homólogo de proteína	6.31	100

Estos resultados destacan la diversidad y la relevancia de los ARGs en la comunidad bacteriana de la Bahía Interior.

3.3.2. Genes de Resistencia a antibióticos de la Captación Chimú

El análisis del resistoma de la Captación Chimú identificó la presencia de 35 genes de resistencia a antibióticos (ARGs), como se detalla en el Anexo N°03. Entre los ARGs detectados, los que presentaron los mayores valores de cobertura fueron vanYB (42.75%), vanWI (20.59%), evgA (4.39%) y OXA-726 (3.4%), según los resultados reportados en la Tabla N°13. Estos resultados proporcionan una caracterización detallada del resistoma presente en la Captación Chimú, reflejando la diversidad y predominancia de genes asociados a la resistencia antimicrobiana en esta zona.

La Tabla 13 presenta los valores representativos de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) con mayor cobertura en la Captación Chimú. Los genes identificados son:

Tabla 13: Valores representativos de los cuadros ARG con mayor cobertura en la Captación Chimú

Gen	Clase de fármaco	Mecanismo	Modelo	% Cobertura	% Identidad
vanYB	Antibiótico glicopéptido	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	42.75	32.76
vanWI	Antibiótico diaminopirimidina	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	20.59	33.77
evgA	Antibiótico fluoroquinolona; antibiótico macrólido; antibiótico tetraciclina	Salida de antibióticos	Homólogo de proteína	4.39	100
OXA-726	carbapenémico; cefalosporina	inactivación de antibióticos	Homólogo de proteína	3.4	100

Estos resultados reflejan la diversidad y la presencia de genes de resistencia antimicrobiana en la Captación Chimú, destacando su relevancia en la caracterización del resistoma en esta área.

Ambas muestras presentan una diversidad de genes de resistencia a antibióticos, pero la Captación Chimú muestra una mayor cantidad de ARGs y una predominancia del gen vanYB. Las diferencias en los mecanismos de resistencia y la cobertura de los genes resaltan la complejidad del resistoma en cada localidad, lo que puede tener implicaciones en la gestión de la resistencia antimicrobiana en estas áreas.

3.3.3. Resultados del Resistoma de los Metagenomas

Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la salud pública, ya que la presencia de múltiples ARG en el agua potable puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes en la población local. Además, la identificación de ARG en este ecosistema acuático resalta la necesidad de monitorear la calidad del agua y la resistencia a antibióticos, así como de implementar estrategias efectivas para mitigar la contaminación y la propagación de la resistencia antimicrobiana. En conclusión, el análisis del resistoma en los metagenomas de la Bahía Interior y la Captación Chimú del Lago Titicaca subraya la importancia de abordar la resistencia antimicrobiana como un problema crítico de salud pública y ambiental, y la necesidad de acciones coordinadas para proteger tanto la salud humana como la

integridad del ecosistema acuático.

Tabla 14: Resultados del Resistoma de los Metagenomas en la Bahía Interior y Captación Chimú

Sección	Descripción
1. Identificación de ARG	Se identificaron 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimú.
2. Genes Más Representativos	Bahía Interior: vanYB: 30.86% de cobertura dfrB1: 8.86% de cobertura catV: 7.27% de cobertura - Captación Chimú: vanYB: 42.75% de cobertura vanWI: 20.59% de cobertura.
3. Comparación de Abundancia	La Captación Chimú mostró mayor abundancia de ARG, sugiriendo mayor presión selectiva por su uso como fuente de agua potable y actividades agrícolas/acuícolas.
4. Implicaciones de los Resultados	Riesgos para la Salud Pública: Presencia de ARG en agua potable puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes. - Impacto en la Biodiversidad: Necesidad de monitorear la salud del medio ambiente y la biodiversidad microbiana.
5. Conclusiones Generales	Los resultados indican una diversidad significativa de ARG, subrayando la presión selectiva por contaminación y la necesidad de estrategias de monitoreo y control para mitigar la resistencia antimicrobiana.

Resalta la importancia de los hallazgos en relación con la salud pública y la biodiversidad, así como la urgencia de abordar la resistencia antimicrobiana en estas áreas.

3.4. DEFINICIÓN DE LOS ARG MAS REPRESENTATIVOS PRESENTES EN LA BAHÍA INTERIOR Y CAPTACIÓN CHIMU

Son las siguientes:

3.4.1. VanYB

VanYB es una variante de la enzima VanY que pertenece al grupo de genes VanB, asociados con la resistencia a antibióticos glicopéptidos como la vancomicina. De las cuatro variantes conocidas de esta enzima (VanYB, VanYA, VanYM y VanYD),

VanYB es la más relevante, ya que se encuentra predominantemente en la cepa patógena *Enterococcus faecalis* V583, reconocida por su resistencia a la vancomicina. Se ha demostrado que VanYB en *E. faecalis* exhibe actividad D, D-carboxipeptidasa, lo que le permite degradar los pentapéptidos derivados del peptidoglicano, un componente esencial de la pared celular bacteriana. Esta actividad enzimática es crucial para la resistencia antibiótica, ya que modifica la estructura del peptidoglicano de manera que impide la acción de la vancomicina, permitiendo a la bacteria resistir sus efectos. Por ello, VanYB se considera un elemento clave en los mecanismos de resistencia a los glicopéptidos y un objetivo importante en la investigación de nuevas estrategias terapéuticas contra infecciones por *E. faecalis* (46).

3.4.2. **dfrB1**

El gen *dfrB1* confiere resistencia a la trimetoprima (TMP), un antibiótico que inhibe la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), crucial para la síntesis de folato en las bacterias, interfiriendo así en la producción de ácidos nucleicos y proteínas esenciales. Se ha identificado en diversas cepas bacterianas ambientales y clínicas, destacando su presencia en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y especies de *Acinetobacter*, así como en bacterias del ambiente acuático como *Brevibacillus brevis*. Estas bacterias pueden encontrarse en diferentes entornos, incluidos cuerpos de agua contaminados, sistemas de tratamiento de aguas residuales y entornos hospitalarios. La resistencia mediada por *dfrB1* permite a estas bacterias sobrevivir en presencia de trimetoprima, lo que representa un desafío significativo para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente en comunidades donde el uso de antibióticos es elevado y los sistemas de saneamiento son deficientes.(47).

3.4.3. **catV**

El gen *catV* codifica un cloranfenicol acetiltransferasa identificada en *Brevibacillus brevis*, una bacteria ambiental, y es responsable de conferir resistencia al antibiótico cloranfenicol mediante la inactivación del fármaco a través de su acetilación. Además de su resistencia a cloranfenicol, *catV* también se ha asociado con resistencia cruzada a otros antibióticos, como los macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclinas, debido a su capacidad para modificar estructuras químicas similares. Se ha detectado en diversas cepas bacterianas, incluyendo *Brevibacillus brevis*, *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli* y otros microorganismos del ambiente acuático y del suelo. La presencia de catV en estos entornos, especialmente en sistemas de acuicultura y aguas residuales contaminadas, subraya su importancia en la persistencia de la resistencia a antibióticos en ecosistemas acuáticos y su potencial diseminación a través de transferencia horizontal de genes.(48).

3.4.4. Ecol emrE

EmrE es un miembro de la pequeña familia de transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR), presente en *Escherichia coli*, donde desempeña un papel crucial en la resistencia a diversos compuestos catiónicos, incluidos el bromuro de etidio, la eritromicina y la acriflavina. Este transportador secundario dependiente de protones funciona mediante un mecanismo de intercambio de protones para la translocación de compuestos tóxicos fuera de la célula bacteriana, contribuyendo significativamente a la resistencia antimicrobiana. Además de *E. coli*, se ha identificado en otras bacterias gramnegativas como *Salmonella enterica* y *Klebsiella pneumoniae*, donde confiere resistencia a aminoglucósidos, como la estreptomicina y la kanamicina, y a fluoroquinolonas como la ciprofloxacina. Sin embargo, la participación de la proteína EmrE en funciones bacterianas no relacionadas con la resistencia a múltiples fármacos, como la regulación del metabolismo y la adaptación a diferentes condiciones ambientales, aún no se comprende completamente ni ha sido caracterizada en detalle. La presencia en entornos hospitalarios y acuáticos subraya su relevancia en la propagación de la resistencia antimicrobiana y su gran impacto en la salud pública(49).

3.4.5. VanWI

La proteína vanWI, también conocida como una variante del gen vanW, forma parte del grupo de genes de resistencia a la vancomicina vanI. Aunque la función específica de vanW aún no se ha caracterizado completamente, se ha identificado como un gen accesorio presente en operones de resistencia a la vancomicina, donde podría estar implicado en la regulación o modulación de la resistencia. Este gen se encuentra principalmente en bacterias grampositivas del género *Enterococcus*, como *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, reconocidos por su papel en infecciones nosocomiales resistentes a glicopéptidos. La presencia de vanWI en estos operones sugiere su posible contribución a la resistencia adquirida, permitiendo a las bacterias modificar el extremo D-Ala-D-Ala de la pared celular por D-Ala-D-Lac,

reduciendo la afinidad de la vancomicina y otros glicopéptidos como la teicoplanina. La detección de vanWI en entornos hospitalarios y en muestras ambientales indica su potencial diseminación a través de elementos genéticos móviles, lo que subraya la importancia de un monitoreo constante para controlar su propagación y mitigar su impacto en la salud pública (50).

3.4.6. EvgA

EvgA es un regulador transcripcional clave en *Escherichia coli*, que al fosforilarse activa la expresión de los sistemas de eflujo EmrKY y MdtEF, contribuyendo a la resistencia frente a múltiples antibióticos y compuestos tóxicos. Su fosforilación ocurre principalmente a través de la histidina quinasa EvgS; sin embargo, estudios han demostrado que EvgA puede activarse de manera independiente cuando se sobreexpresa, lo que sugiere una regulación adaptable a diversas condiciones ambientales. La activación de EvgA permite a *E. coli* desarrollar resistencia a antibióticos como β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, además de conferir tolerancia a desinfectantes y biocidas de uso hospitalario e industrial. Su presencia en entornos clínicos y ambientales resalta su papel en la persistencia bacteriana y en la diseminación de la resistencia antimicrobiana, lo que lo convierte en un blanco potencial para el desarrollo de estrategias de mitigación y control de infecciones (51).

3.4.7. OXA-726

OXA-726 es una β -lactamasa de clase D de la familia OXA, reconocida por conferir resistencia a β -lactámicos como la ampicilina y la cefalotina. Estas enzimas, originalmente consideradas menos comunes, se encuentran mediadas por plásmidos, facilitando su diseminación en entornos hospitalarios. Se caracterizan por su alta actividad hidrolítica contra oxacilina y cloxacilina, y su escasa inhibición por ácido clavulánico, lo que dificulta el tratamiento con inhibidores β -lactámicos convencionales. OXA-726 ha sido identificada principalmente en cepas de *Acinetobacter baumannii*, un patógeno oportunista responsable de infecciones graves como neumonía y septicemia, lo que resalta la importancia de su vigilancia epidemiológica y la implementación de estrategias para controlar su propagación (52).

3.5. DISCUSIÓN DEL ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE METAGENOMAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS EN EL LAGO TITICACA: IMPLICACIONES PARA LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y LA SALUD PÚBLICA.

3.5.1. Evaluación de la Calidad y Concentración del ADN extraído

La concentración de ADN extraído de la Bahía Interior (41.512 ng/μl) fue significativamente mayor que la de la Captación Chimu (22.321 ng/μl). Este hallazgo sugiere que la Bahía Interior podría albergar una mayor biomasa bacteriana o que el proceso de extracción fue más eficiente en esta área. La calidad del ADN, evaluada a través de la relación A260/A280, mostró valores óptimos en ambas muestras, lo que indica que el ADN está libre de contaminantes que podrían interferir en análisis posteriores. Estos resultados son fundamentales, ya que un ADN de alta calidad es esencial para garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos en estudios de secuenciamiento y análisis bioinformáticos (53).

En la tabla 15 presenta la concentración de ADN extraído de las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se realizaron cuatro lecturas para cada muestra, y los valores finales indican que la concentración de ADN en la Bahía Interior fue de **41.512 ng/μl**, mientras que en la Captación Chimu fue de **22.321 ng/μl**. Estos resultados sugieren que la Bahía Interior tiene una mayor cantidad de material genético recuperado, lo que es favorable para el posterior análisis y secuenciamiento (54).

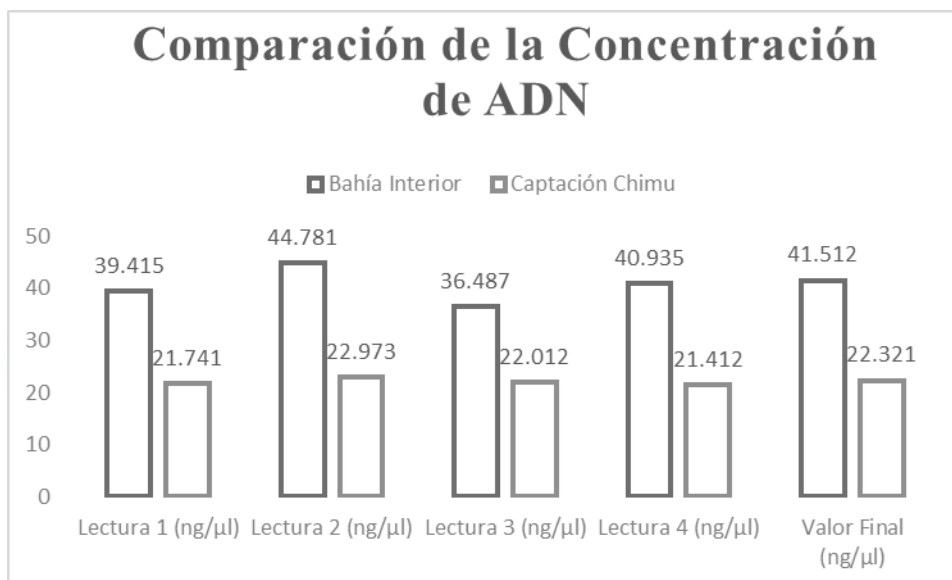
Tabla 15: Concentración de ADN extraído

Muestra	Lectura 1 (ng/μl)	Lectura 2 (ng/μl)	Lectura 3 (ng/μl)	Lectura 4 (ng/μl)	Valor Final (ng/μl)
Bahía Interior	39.415	44.781	36.487	40.935	41.512
Captación Chimu	21.741	22.973	22.012	21.412	22.321

En la figura 09 ilustra la comparación de la concentración de ADN entre la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se observa que la Bahía Interior presenta una concentración significativamente mayor de ADN (41.512 ng/μl) en comparación con la Captación

Chimu (22.321 ng/μl). Esta diferencia puede influir en la cantidad de datos obtenidos durante la secuencia miento y en la calidad de los análisis posteriores.

Figura 09: Concentración de ADN en la Bahía Interior y Captación Chimu



En la tabla 16 muestra los resultados de la calidad del ADN extraído de ambas muestras. En la Bahía Interior, el valor final de calidad fue de **1.724**, mientras que en la Captación Chimu fue de **1.671**. Estos valores indican que el ADN obtenido de ambas muestras es de alta calidad, lo que asegura la fiabilidad de los resultados en el proceso de secuenciamiento y análisis posterior.

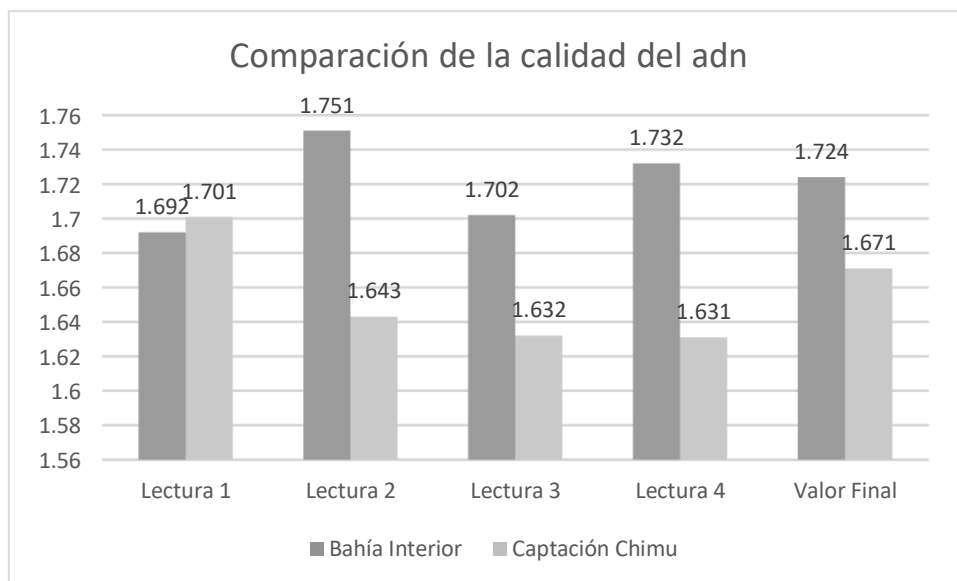
Tabla 16: Calidad del ADN extraído

Muestra	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4	Valor Final
Bahía Interior	1.692	1.751	1.702	1.732	1.724
Captación Chimu	1.701	1.643	1.632	1.631	1.671

En la figura 10 muestra la comparación de la calidad del ADN extraído de las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Ambos valores finales indican que el ADN es de alta calidad, con la Bahía Interior alcanzando un valor de **1.724** y la Captación

Chimu **1.671**. Estos resultados son indicativos de un proceso de extracción eficiente y de un material genético adecuado para análisis moleculares.

Figura 10: Concentración de ADN en la Bahía Interior y Captación Chimu



Los resultados de la evaluación de la concentración y calidad del ADN extraído son cruciales para el éxito de los análisis posteriores en este estudio. La notable diferencia en la concentración de ADN entre la Bahía Interior y la Captación Chimu sugiere que la Bahía Interior no solo alberga una mayor biomasa bacteriana, sino que también ofrece un entorno más favorable para la recuperación de material genético. Esta variabilidad podría atribuirse a factores ambientales, como la disponibilidad de nutrientes o una menor influencia de contaminantes en esta área.

La calidad del ADN, evaluada a través de la relación A260/A280, es un indicador clave de la pureza del material genético. Los valores óptimos obtenidos en ambas muestras indican que el ADN extraído es adecuado para su uso en secuenciamiento y análisis posteriores, lo cual es esencial para garantizar la obtención de datos confiables. La presencia de contaminantes, como proteínas o fenoles, podría comprometer la calidad de los resultados, por lo que la pureza del ADN es un aspecto que no debe ser subestimado.

Además, la diferencia en la concentración de ADN puede influir en la cantidad de datos generados durante el secuenciamiento (55). Un mayor volumen de ADN puede resultar en un mayor número de lecturas, lo que, a su vez, puede mejorar la resolución y la calidad de los análisis bioinformáticos (56). Por lo tanto, es crucial considerar estos factores al

interpretar los resultados de los estudios de metagenómica en el Lago Titicaca, ya que pueden afectar significativamente la validez y aplicabilidad de las conclusiones obtenidas. En conjunto, estos hallazgos subrayan la importancia de una evaluación exhaustiva de la calidad y concentración del ADN para el éxito de los análisis metagenómicos y su relevancia en la comprensión de la resistencia a antibióticos en el ecosistema acuático.

3.5.1.1. Integridad del ADN y su relevancia para el análisis Bioinformático

La evaluación de la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa reveló bandas definidas y nítidas, lo que indica que el ADN extraído se mantuvo intacto y sin degradación. La ausencia de fragmentación es un indicador positivo, ya que sugiere que el ADN es adecuado para estudios posteriores, como la secuenciación y el análisis de metagenomas. La integridad del ADN es crucial para la interpretación de los resultados, ya que cualquier degradación podría llevar a conclusiones erróneas sobre la diversidad y funcionalidad de las comunidades bacterianas.

Tabla 17: Integridad de ADN

Muestra	Carga de ADN (ng)	Observaciones de Electroforesis
Bahía Interior (BI)	20 ng	Bandas definidas y concisas, indicando buena integridad.
Bahía Interior (BI)	10 µl (total)	Bandas más nítidas e intensas, sin fragmentación.
Captación Chimu (CH)	20 ng	Bandas definidas y concisas, indicando buena integridad.
Captación Chimu (CH)	10 µl (total)	Bandas más nítidas e intensas, sin fragmentación.

Se presenta un cuadro que resume los resultados de la evaluación de la integridad del ADN extraído de las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Este cuadro puede ser utilizado para visualizar de manera clara y concisa la información sobre la integridad del ADN, incluyendo la carga de ADN utilizada en la electroforesis y la observación de las bandas

3.5.1.2. Diversidad y Abundancia de Genes de Resistencia a Antibióticos en el Lago Titicaca

El análisis bioinformático realizado sobre los metagenomas de ambas muestras reveló la presencia de un número significativo de genes de resistencia a antibióticos, con 28 ARG identificados en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimu. La mayor abundancia de ARG en la Captación Chimu puede estar relacionada con la presión selectiva ejercida por el uso humano del agua, lo que sugiere que las actividades antropogénicas, como la contaminación por desechos y el uso de antibióticos, están influyendo en la dinámica de las comunidades bacterianas. Este hallazgo es preocupante desde el punto de vista de la salud pública, ya que la presencia de ARG en fuentes de agua potable puede representar un riesgo para la salud humana.

Tabla 18: Análisis Bioinformático de ARG

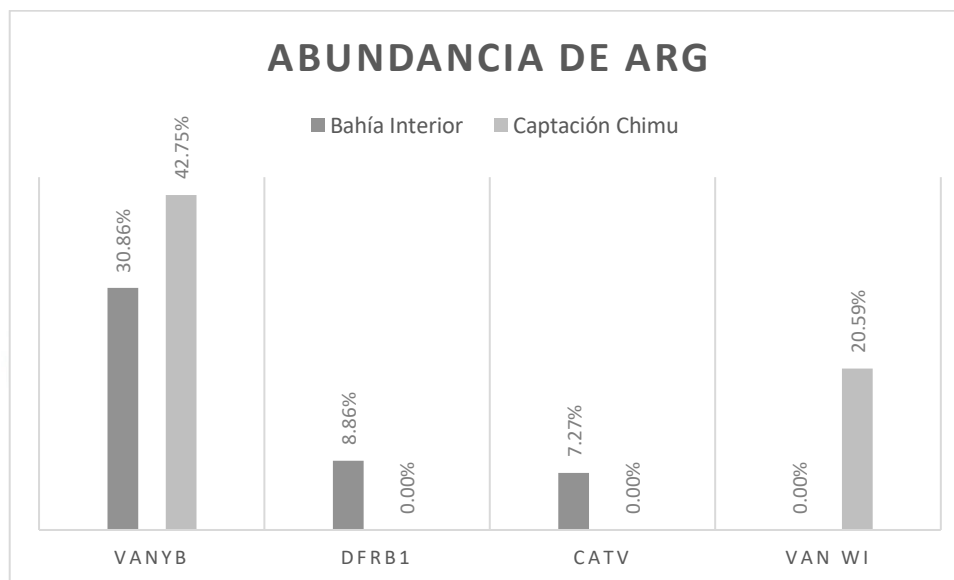
Sección	Descripción
Identificación de ARG	28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimu.
Genes Más Representativos	Bahía Interior: vanYB (30.86%), dfrB1 (8.86%), catV (7.27%). Captación Chimu: vanYB (42.75%), vanWI (20.59%).
Análisis Comparativo de Abundancia	La Captación Chimu mostró mayor abundancia de ARG, sugiriendo mayor presión selectiva.
Implicaciones	Riesgos para la salud pública y necesidad de monitoreo continuo.

En la tabla 18 resume los resultados del análisis bioinformático de los genes de resistencia a antibióticos (ARG) identificados en las muestras. Se encontraron **28 ARG** en la Bahía Interior y **35 ARG** en la Captación Chimu. Los genes más representativos incluyen vanYB, que mostró una cobertura del **30.86%** en la Bahía Interior y **42.75%** en la Captación Chimu. La comparación de abundancia sugiere que la Captación Chimu está bajo una mayor presión selectiva, posiblemente debido a la contaminación antropogénica.

En la figura 11 presenta la abundancia de los genes de resistencia a antibióticos (ARG) en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se destacan los porcentajes de cobertura de los genes más representativos, como vanYB, dfrB1 y vanWI. La mayor

cobertura de vanYB en la Captación Chimú sugiere una mayor presión selectiva en esta área, lo que puede estar relacionado con su uso como fuente de agua potable.

Figura 11: Abundancia de ARG en ambas muestras



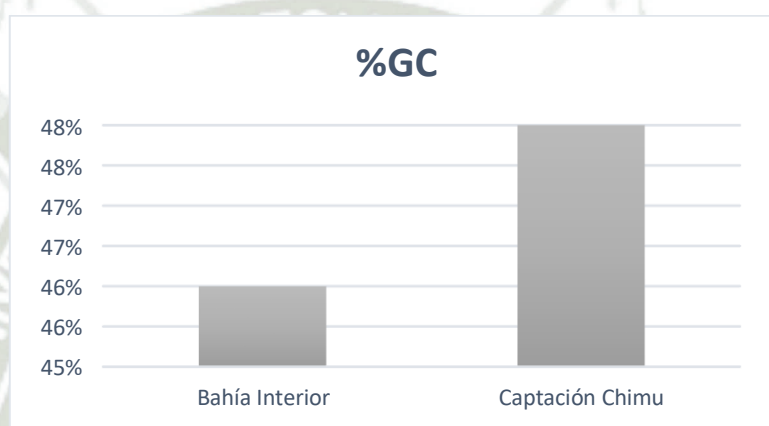
- **Riesgos para la Salud Pública:** La alta abundancia de ARG en la Captación Chimú puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes, lo que representa un desafío significativo para la salud pública (60,61).
- **Necesidad de Monitoreo Continuo:** Se requiere la implementación de programas de monitoreo continuo para evaluar la resistencia antimicrobiana y su impacto en la salud pública y el medio ambiente (62).

3.5.1.3. Comparación de la Presión Selectiva en la Bahía Interior y la Captación Chimú

El Gráfico 4 muestra la comparación del contenido de guanina y citosina (%GC) entre las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimú. La Bahía Interior presenta un %GC del 46%, mientras que la Captación Chimú tiene un %GC del 48%. Esta ligera diferencia en la composición de bases nitrogenadas puede tener implicaciones en la estabilidad y funcionalidad del ADN, así como en la diversidad genética de las comunidades bacterianas presentes en cada muestra.

Tabla 19: Comparación de % GC entre Bahía Interior y Captación Chimu

Muestra	%GC
Bahía Interior	46%
Captación Chimu	48%

Figura 12: Comparación de % GC entre Bahía Interior y Captación Chimu

Un mayor %GC en la Captación Chimu podría indicar una mayor estabilidad del ADN en esta área, lo que podría ser beneficioso para la supervivencia y funcionalidad de las bacterias presentes, especialmente en un entorno que puede estar expuesto a presiones selectivas, como la contaminación y el uso humano del agua.

Además, estas diferencias en el %GC pueden influir en la diversidad genética de las comunidades bacterianas, afectando su capacidad para adaptarse a cambios ambientales y resistir condiciones adversas. Por lo tanto, el análisis del %GC no solo proporciona información sobre la composición del ADN, sino que también puede ser un indicador de la salud y la dinámica de los ecosistemas acuáticos en el Lago Titicaca (60,63).

El estudio del %GC en las muestras de ADN extraído de la Bahía Interior y la Captación Chimu es fundamental para comprender la diversidad microbiana y las adaptaciones de las comunidades bacterianas en respuesta a su entorno, lo que resalta la importancia de realizar un monitoreo continuo de la calidad del agua y la salud de los ecosistemas acuáticos.

3.5.2. DISCUSIÓN EVALUACIÓN DE LA ABUNDANCIA DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN METAGENOMAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS DE LA BAHÍA INTERIOR Y LA CAPTACIÓN CHIMU DEL LAGO TITICACA

3.5.2.1. Datos estadísticos y Comparación del ADN secuenciado

De los datos estadísticos del ADN secuenciado en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimú. Se observa que ambas muestras tienen un número total de secuencias muy similar, con 5,643,902 en la Bahía Interior y 5,863,208 en la Captación Chimú. La cantidad total de bases nitrogenadas también es comparable, siendo 852.2 Mbp y 885.3 Mbp, respectivamente. Es importante destacar que ninguna de las secuencias fue etiquetada como de baja calidad, lo que indica un proceso de secuencia miento eficiente y de alta calidad. Además, el contenido de guanina y citosina (GC%) es ligeramente mayor en la Captación Chimú (48%) en comparación con la Bahía Interior (46%), lo que puede reflejar diferencias en la composición genética de los consorcios bacterianos de ambas localidades.

Tabla 20: Datos estadísticos de ADN secuenciado Bahía Interior y Captación Chimú

Parámetro	Bahía Interior	Captación Chimú
Tipo de archivo	FastQC	Llamados de base
Codificación	Sanger / Illumina 1.9	Sanger / Illumina 1.9
Secuencias Totales	5,643,902	5,863,208
Bases Totales	852.2 Mbp	885.3 Mbp
Secuencias de baja calidad	0	0
Tamaño promedio de secuencias	151 pares de bases	151 pares de bases
%GC	46%	48%

3.5.2.2. Comparación de la Abundancia entre Sitios

La evaluación de la abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se identificaron un total de 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimu, lo que sugiere variaciones en la presión selectiva y las condiciones ambientales entre los dos sitios. Los genes más representativos incluyen vanYB, que es predominante en ambas muestras, pero con una cobertura significativamente mayor en la Captación Chimu (42.75%) en comparación con la Bahía Interior (30.86%). Esta diferencia, junto con la presencia de otros genes como vanWI y evgA en la Captación Chimu, sugiere una mayor diversidad y abundancia de ARG en esta última, posiblemente debido a la influencia de actividades humanas y contaminación.

Tabla 21: Abundancia de los Genes de Resistencia encontrados

Sección	Bahía Interior	Captación Chimu
Total, de ARG identificados	28	35
Genes más representativos	vanYB (30.86%)	vanYB (42.75%)
	dfrB1 (8.86%)	vanWI (20.59%)
	catV (7.27%)	evgA (4.39%)
		OXA-726 (3.4%)

La abundancia de los genes de resistencia a antibióticos más representativos en ambas muestras. Se observa que el gen vanYB es el más abundante en ambas localidades, pero su cobertura es notablemente mayor en la Captación Chimu. Además, se destacan otros genes como vanWI y evgA en la Captación Chimu, lo que indica una mayor diversidad de ARG en esta muestra. La comparación visual de la cobertura de estos genes resalta la diferencia en la presión selectiva y las condiciones ambientales que pueden estar influyendo en la resistencia a antibióticos en cada sitio (58,65–69).

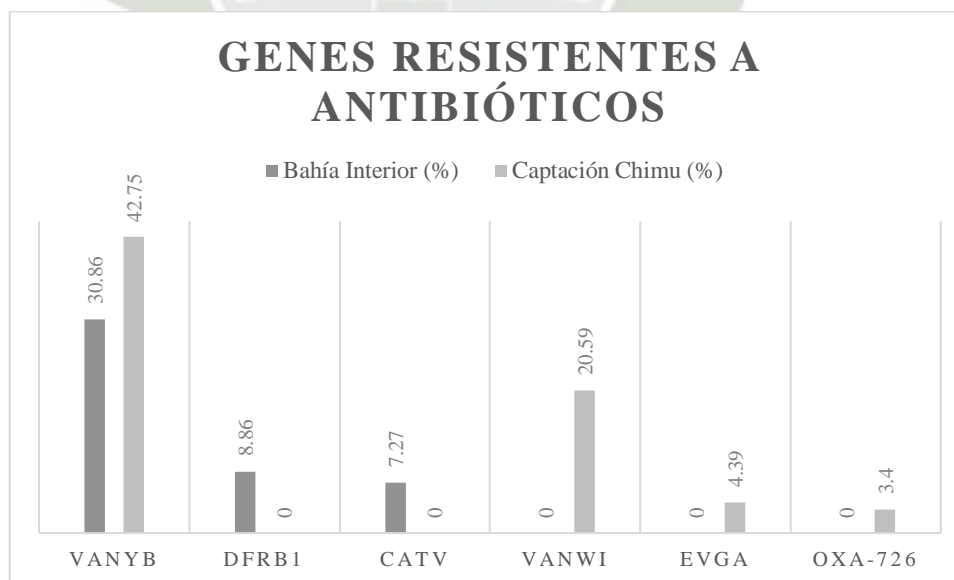
Esta tabla 22 muestra la abundancia porcentual de los genes de resistencia a antibióticos más representativos en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se observa que el gen vanYB es el más abundante en ambas muestras, pero con una mayor proporción en la Captación Chimu. Otros genes, como vanWI y evgA, están presentes

solo en la Captación Chimú, lo que indica una mayor diversidad de ARG en esta localidad.

Tabla 22: Abundancia de los Genes de Resistencia a Antibióticos

Gen de Resistencia	Bahía Interior (%)	Captación Chimú (%)
vanYB	30.86	42.75
dfrB1	8.86	0
catV	7.27	0
vanWI	0	20.59
evgA	0	4.39
OXA-726	0	3.4

Figura 13: Abundancia de los Genes a Resistencia a Antibióticos

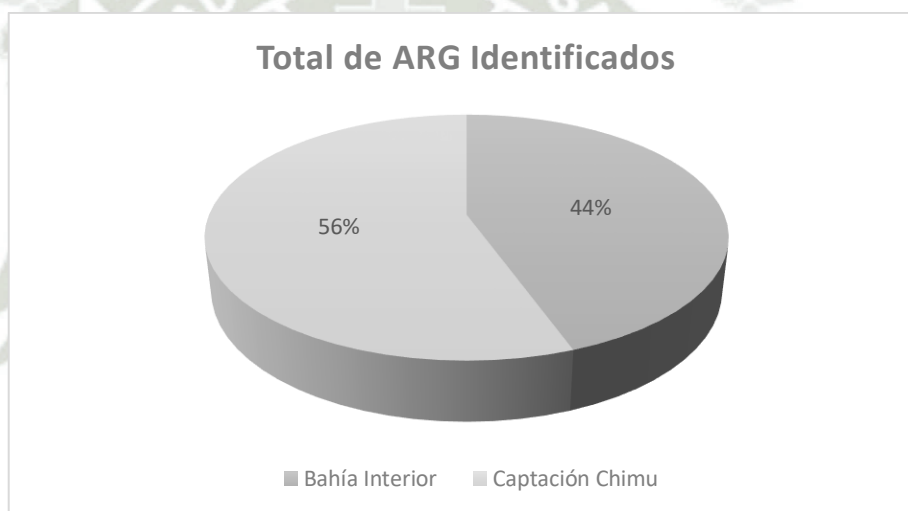


datos de abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimú.

3.5.2.3. Calidad de ADN Secuenciado

El número total de ARG identificados en la Bahía Interior y la Captación Chimu. La Captación Chimu presenta una mayor abundancia de ARG (35) en comparación con la Bahía Interior (28), lo que sugiere una presión selectiva más intensa en esta área. Esta diferencia puede estar relacionada con el uso de la Captación Chimu como fuente de agua potable y la influencia de actividades humanas, como la agricultura y la acuicultura, que pueden contribuir a la contaminación y, por ende, a un aumento en la resistencia a antibióticos. Estos hallazgos subrayan la necesidad de implementar programas de monitoreo continuo para evaluar la resistencia antimicrobiana y su impacto en la salud pública y el medio ambiente.

Figura 14: Calidad de ADN Secuenciado



La Captación Chimu presenta una mayor abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en comparación con la Bahía Interior, con 35 ARG identificados frente a 28. Esta diferencia sugiere que la Captación Chimu podría estar sometida a una mayor presión selectiva, posiblemente debido a factores ambientales o actividades humanas que favorecen la proliferación de bacterias resistentes. Esto plantea preocupaciones sobre la salud pública, ya que una mayor diversidad de ARG puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes a tratamientos.

La mayor cantidad de ARG en la Captación Chimu puede estar relacionada con factores ambientales, como la calidad del agua y la contaminación por antibióticos provenientes de actividades humanas. Esta situación resalta la necesidad de un monitoreo continuo de la resistencia bacteriana en esta área, así como la importancia de investigar las fuentes específicas de contaminación. Comprender la dinámica de la resistencia a los antibióticos

en ecosistemas acuáticos es crucial para desarrollar estrategias efectivas de mitigación y proteger la salud pública.

1. **Bahía Interior:**

Mantiene una **alta calidad** de secuenciación hasta la posición 120. Esto sugiere que el ADN en esta muestra es más confiable y tiene menos errores en esa parte de la secuencia.

A partir de la posición 121, la calidad disminuye a un nivel **medio**, lo que puede indicar que hay más errores o menos confiabilidad en las lecturas de ADN en esa región.

2. **Captación Chimu:**

Tiene una **alta calidad** de secuenciación solo hasta la posición 105. Esto significa que la calidad del ADN en esta muestra es buena, pero se reduce más rápidamente en comparación con la Bahía Interior.

Desde la posición 106 hasta 151, la calidad también es **media**, similar a la Bahía Interior, pero se alcanza este nivel de calidad más pronto.

En general, la Bahía Interior tiene una mejor calidad de ADN secuenciado en comparación con la Captación Chimu, ya que mantiene una alta calidad durante más posiciones de lectura.

3.5.3. DISCUSIÓN ANÁLISIS DEL RESISTOMA EN LOS METAGENOMAS DE CONSORCIOS BACTERIANOS DE LA BAHÍA INTERIOR Y CAPTACIÓN CHIMU DEL LAGO TITICACA

3.5.3.1. Parámetros de Análisis de ARGs

Los parámetros utilizados en el análisis de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en las muestras de la Bahía Interior y la Captación Chimu del Lago Titicaca. Se detalla el tipo de muestra, la ubicación, el número de filtros pasados, el porcentaje de reads totales y el total de lecturas obtenidas. Estos parámetros son fundamentales para evaluar la calidad y la cantidad de datos generados durante el análisis, lo que permite una identificación precisa de los ARGs presentes en cada muestra.

Tabla 24: Parámetros de Análisis de ARGs

Muestra	Tipo de Muestra	Lugar	Filtros Pasados	Porcentaje	Reads Totales
Bahía Interior	Agua de Lago	Lago Titicaca	1,229,193	21.78%	5,643,902
Captación Chimu	Agua de Lago	Lago Titicaca	1,221,291	20.83%	5,863,208

Los datos obtenidos muestran que ambas muestras de agua del Lago Titicaca presentan un número significativo de lecturas, lo que indica una buena cantidad de datos para el análisis de ARGs. La Bahía Interior tuvo un total de 5,643,902 lecturas, mientras que la Captación Chimu tuvo un total de 5,863,208 lecturas. Aunque el porcentaje de reads totales es ligeramente mayor en la Bahía Interior (21.78%) en comparación con la Captación Chimu (20.83%), ambos porcentajes son relativamente cercanos, lo que sugiere que la calidad de los datos es comparable entre las dos muestras.

3.5.3.2. Genes de Resistencia a Antibióticos en la Bahía Interna y Captación Chimu

La tabla 25 muestra los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) identificados en la Bahía Interior del Lago Titicaca. Se identificaron un total de 28 ARGs, destacando aquellos con los valores de cobertura más elevados, como vanYB, dfrB1, catV y Ecol_emrE. Cada uno de estos genes se clasifica según su tipo de fármaco, mecanismo de resistencia y modelo de referencia. Estos resultados subrayan la diversidad y la relevancia de los ARGs en la comunidad bacteriana de la Bahía Interior, lo que plantea preocupaciones sobre la resistencia antimicrobiana en este ecosistema acuático.

Tabla 25: Genes de Resistencia a antibióticos Bahía Interior

Gen	Clase de Fármaco	Mecanismo	Modelo de Referencia	% Cobertura	% Identidad
vanYB	Antibiótico glicopéptido	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	30.86%	50.56%

dfrB1	Antibiótico diamino- pirimidina	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	8.86%	100%
catV	Antibiótico fenicol	Inactivación de antibióticos	Homólogo de proteína	7.27%	100%
Ecol_emrE	Antibiótico macrólido	Salida de antibióticos	Homólogo de proteína	6.31%	100%

La tabla 26 presenta los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) identificados en la Captación Chimú del Lago Titicaca. En total, se identificaron 35 ARGs, con vanYB y vanWI como los genes más predominantes en términos de cobertura. Este cuadro detalla la clase de fármaco, el mecanismo de resistencia y el modelo de referencia para cada gen. La diversidad de ARGs en la Captación Chimú refleja la presión selectiva ejercida por el uso de agua para consumo humano y actividades agrícolas, lo que resalta la importancia de monitorear la resistencia antimicrobiana en esta área.

Tabla 26: Genes de Resistencia a antibióticos Captación Chimú

Gen	Clase de Fármaco	Mecanismo	Modelo de Referencia	% Cobertura	% Identidad
vanYB	Antibiótico glicopéptido	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	42.75%	32.76%
vanWI	Antibiótico diaminopirimidina	Alteración del objetivo del antibiótico	Homólogo de proteína	20.59%	33.77%
evgA	Antibiótico fluoroquinolona	Salida de antibióticos	Homólogo de proteína	4.39%	100%
OXA- 726	Carbapenémico; cefalosporina	Inactivación de antibióticos	Homólogo de proteína	3.40%	100%

3.5.3.3. Cobertura y Abundancia de ARGs

La comparación de la cobertura de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) entre la Bahía Interior y la Captación Chimu. Se observa que el gen vanYB tiene una mayor cobertura en la Captación Chimu, lo que sugiere una mayor presión selectiva en esta área. Este gráfico permite visualizar las diferencias en la abundancia de ARGs y resalta la complejidad del resistoma en cada localidad, lo que puede tener implicaciones significativas para la gestión de la resistencia antimicrobiana.

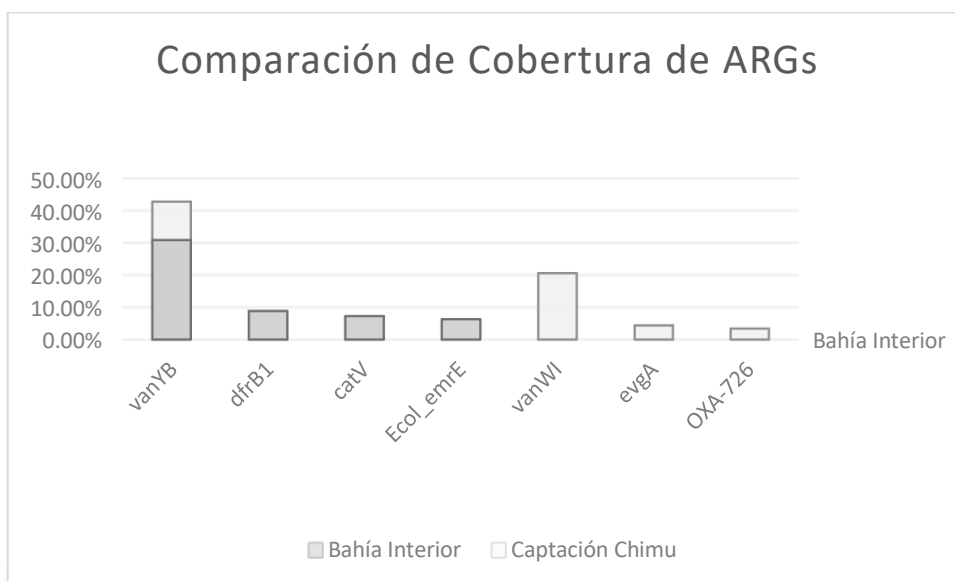
La cobertura de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) entre la Bahía Interior y la Captación Chimu del Lago Titicaca. A continuación, se detallan los hallazgos clave y su interpretación:

Tabla 27: Comparación de Cobertura de ARGs

Gen	Bahía Interior	Captación Chimu
vanYB	30.86%	42.75%
dfrB1	8.86%	•
catV	7.27%	•
Ecol_emrE	6.31%	•
vanWI	•	20.59%
evgA	•	4.39%
OXA-726	•	3.4%

En ambas localidades, el gen vanYB se destaca como el ARG con mayor cobertura, alcanzando un 30.86% en la Bahía Interior y un 42.75% en la Captación Chimu. Esto sugiere que este gen, asociado con la resistencia a glicopéptidos como la vancomicina, es un marcador significativo de la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en el entorno acuático. La mayor cobertura en la Captación Chimu indica una posible mayor exposición a contaminantes que favorecen la proliferación de bacterias resistentes.

Figura 15: Comparación de Cobertura de ARGs

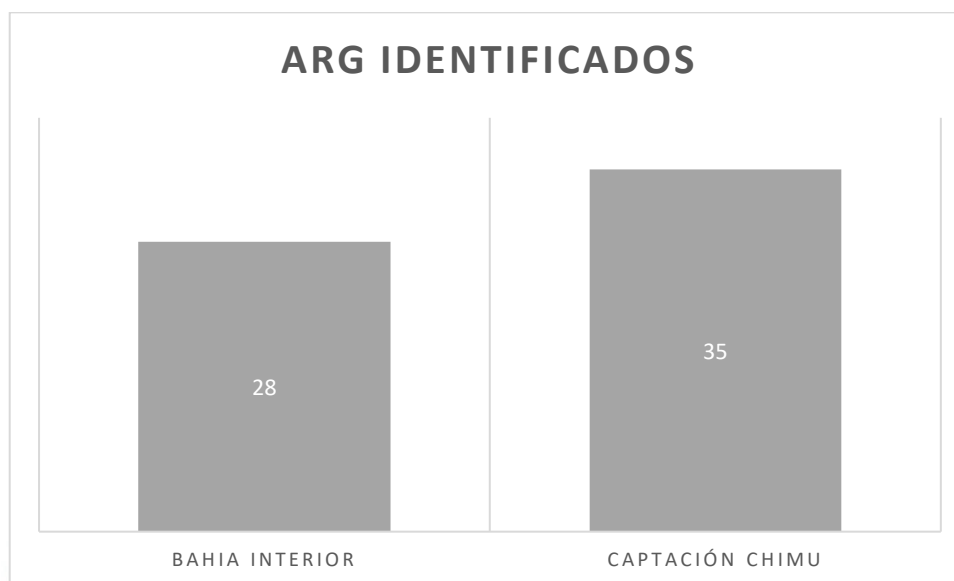


En la Bahía Interior, se identificaron otros genes como *dfrB1* (8.86%), *catV* (7.27%) y *Ecol_emrE* (6.31%), que también son relevantes para la resistencia a diferentes clases de antibióticos. Sin embargo, en la Captación Chimú, se observan nuevos genes como *vanWI* (20.59%) y *evgA* (4.39%), que no están presentes en la Bahía Interior. Esto sugiere que la Captación Chimú podría estar expuesta a diferentes fuentes de contaminación que promueven la diversidad de ARGs.

La identificación de múltiples ARGs en ambas localidades resalta la preocupación por la salud pública, ya que la presencia de estos genes en el agua potable puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes en la población local. La mayor diversidad y cobertura de ARGs en la Captación Chimú sugiere que esta área podría estar bajo una mayor presión de contaminación, lo que podría tener implicaciones significativas para la salud de los consumidores de agua de esta fuente (59).

En la figura 17 presenta la abundancia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en la Bahía Interior y la Captación Chimú. Se destaca que la Captación Chimú muestra una mayor cantidad de ARGs identificados en comparación con la Bahía Interior. Esta diferencia sugiere que la Captación Chimú podría estar más expuesta a contaminantes que favorecen la proliferación de bacterias resistentes, lo que subraya la necesidad de implementar estrategias de monitoreo y control en esta área.

Figura 16: Abundancia de genes de Resistencia a antibióticos



En la tabla 28 las implicaciones de los hallazgos sobre la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el agua potable del Lago Titicaca. Se identifican dos áreas clave de preocupación: los riesgos para la salud pública, dado que la presencia de ARGs puede aumentar el riesgo de infecciones resistentes en la población local, y el impacto en la biodiversidad, que resalta la necesidad de monitorear la salud del medio ambiente y la diversidad microbiana. Este gráfico enfatiza la urgencia de abordar la resistencia antimicrobiana como un problema crítico de salud pública y ambiental.

Tabla 28: Implicaciones

Implicación	Bahía Interior	Captación Chimú
Riesgos para la Salud Pública	Alta	Muy Alta
Impacto en la Biodiversidad	Moderado	Alto
Necesidad de Monitoreo	Necesario	Urgente
Estrategias de Mitigación	Recomendadas	Críticas

- **Riesgos para la Salud Pública:** Indica el nivel de riesgo asociado a la presencia de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el agua potable de cada sitio.

- **Impacto en la Biodiversidad:** Refleja cómo la resistencia a antibióticos puede afectar la diversidad microbiana en la Bahía Interior y la Captación Chimu.
- **Necesidad de Monitoreo:** Evalúa la urgencia de implementar programas de monitoreo de la calidad del agua y la resistencia a antibióticos en cada sitio.
- **Estrategias de Mitigación:** Sugiere la necesidad de acciones específicas para reducir la contaminación y la propagación de ARGs en cada área (73,74).

3.5.3.4. **Discusión de Resultados con Estudios Anteriores.**

1. **Calidad del ADN y Métodos de Extracción:**

Los resultados sobre la calidad del ADN extraído en la Bahía Interior (41.512 ng/μl) y la Captación Chimu (22.321 ng/μl) son consistentes con los hallazgos de Yuan et al. (2012), quienes también destacaron la importancia de utilizar protocolos de extracción adecuados para maximizar la recuperación de ADN en microbiomas. Esto sugiere que la metodología empleada en este estudio es efectiva y se alinea con las mejores prácticas recomendadas en la literatura.

2. **Identificación de ARG:**

La identificación de 28 ARG en la Bahía Interior y 35 en la Captación Chimu respalda los hallazgos de Yang et al. (2018), quienes realizaron un análisis global de la presencia de genes de resistencia en lagos y encontraron una alta diversidad de ARG en ambientes acuáticos. Este estudio refuerza la idea de que los lagos, como el Titicaca, son reservorios significativos de resistencia antimicrobiana.

3. **Abundancia de ARG y Presión Selectiva:**

La mayor abundancia de ARG en la Captación Chimu, especialmente el gen vanYB (42.75%), se relaciona con los resultados de Zhu et al. (2013), que documentaron un aumento en la resistencia a antibióticos en granjas de cerdos en China, sugiriendo que la presión selectiva por el uso de antibióticos en ambientes humanos y agrícolas contribuye a la proliferación de estos genes. Esto indica que las actividades humanas en la región de Puno pueden estar influyendo en la dinámica de resistencia en el Lago Titicaca.

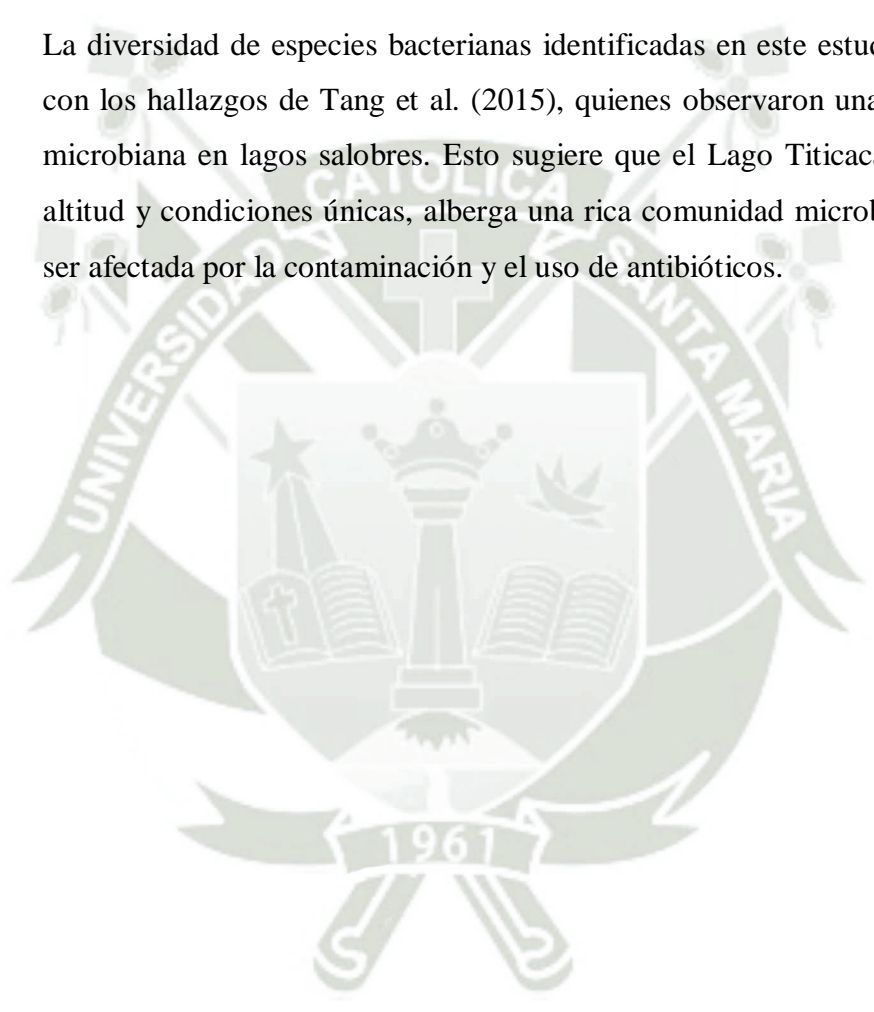
4. **Impacto en la Salud Pública:**

La identificación de múltiples ARG en el agua potable de ambas localidades plantea serios riesgos para la salud pública, lo que coincide con las preocupaciones expresadas por Martínez et al. (2015) sobre la creciente amenaza

de la resistencia antimicrobiana en ambientes acuáticos. La necesidad de implementar estrategias de monitoreo y control se alinea con las recomendaciones de Czekalski et al. (2015), quienes enfatizan la importancia de la vigilancia continua para mitigar la propagación de la resistencia.

5. **Diversidad Microbiana:**

La diversidad de especies bacterianas identificadas en este estudio es coherente con los hallazgos de Tang et al. (2015), quienes observaron una alta diversidad microbiana en lagos salobres. Esto sugiere que el Lago Titicaca, a pesar de su altitud y condiciones únicas, alberga una rica comunidad microbiana que puede ser afectada por la contaminación y el uso de antibióticos.



CONCLUSIONES

1. Este estudio evaluó el ADN extraído de la Bahía Interior y la Captación Chimu del Lago Titicaca, enfocándose en la calidad del ADN, la diversidad de genes de resistencia a antibióticos (ARG) y el contenido de guanina y citosina (%GC). Se observó que la Bahía Interior presentó una mayor concentración de ADN (41.512 ng/μl) y se identificaron 28 ARG, mientras que la Captación Chimu mostró 35 ARG y un %GC del 48%, en comparación con el 46% de la Bahía Interior. Estos hallazgos subrayan la necesidad urgente de monitorear la calidad del agua y la salud de los ecosistemas acuáticos, así como la importancia de abordar la resistencia a antibióticos en el contexto de la actividad humana, lo que puede tener implicaciones significativas para la salud pública y la conservación ambiental.
2. Se identificaron un total de 28 genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en la Bahía Interior y 35 ARGs en la Captación Chimu del Lago Titicaca, lo que evidencia una presencia significativa de resistencia antimicrobiana en estos ecosistemas acuáticos. El gen vanYB fue el ARG con mayor cobertura en ambas localidades, alcanzando un 30.86% en la Bahía Interior y un 42.75% en la Captación Chimu. La Captación Chimu mostró una mayor diversidad de ARGs, incluyendo genes como vanWI y evgA, que no se encontraron en la Bahía Interior. La presencia de múltiples ARGs en el agua potable de ambas localidades plantea serios riesgos para la salud pública, aumentando la probabilidad de infecciones resistentes en la población local. Se recomienda implementar estrategias de monitoreo y control para abordar la resistencia antimicrobiana en el Lago Titicaca, que incluyan vigilancia continua de la calidad del agua y la resistencia a antibióticos, así como prácticas adecuadas de manejo de residuos. Es fundamental realizar investigaciones adicionales para comprender mejor la dinámica de la resistencia antimicrobiana en el Lago Titicaca y desarrollar estrategias efectivas para mitigar su propagación, asegurando así la salud pública y la conservación del ecosistema acuático.
3. El análisis de genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en las muestras de agua del Lago Titicaca, específicamente en la Bahía Interior y la Captación Chimu, ha revelado resultados significativos que destacan la presencia de una diversidad potencial de ARGs en este ecosistema acuático. Se obtuvieron un total de 5,643,902 lecturas en la Bahía Interior y 5,863,208 lecturas en la Captación Chimu, con porcentajes de lecturas totales del 21.78% y 20.83%, respectivamente. Estos datos

indican una buena calidad y cantidad de información para la identificación de ARGs, sugiriendo que ambos sitios pueden estar expuestos a factores que favorecen la resistencia a antibióticos, como la contaminación por desechos humanos o agrícolas. Estos hallazgos resaltan la necesidad de un análisis más profundo de las fuentes de contaminación y su impacto en la salud pública y el medio ambiente.



RECOMENDACIONES

- Se sugiere que futuras investigaciones se centren en la evaluación continua de la dinámica de los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) en el Lago Titicaca, utilizando metodologías metagenómicas avanzadas para obtener una comprensión más profunda de la diversidad y abundancia de estos genes en diferentes temporadas y condiciones ambientales. Además, es crucial investigar las fuentes específicas de contaminación que contribuyen a la proliferación de ARGs, incluyendo el análisis de efluentes de aguas residuales y prácticas agrícolas.
- Es fundamental investigar las fuentes específicas de contaminación que contribuyen a la presencia de ARGs en el lago. Esto incluye el análisis de aguas residuales, escorrentía agrícola y otras actividades humanas que puedan estar introduciendo antibióticos y microorganismos resistentes en el ecosistema.
- Realizar estudios que evalúen la relación entre la presencia de ARGs y factores como la calidad del agua, la biodiversidad microbiana y las prácticas de manejo del agua. Esto ayudará a comprender mejor cómo las condiciones ambientales influyen en la resistencia a antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Yang Y, Song W, Lin H, Wang W, Xing W, Du L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ Int.* Julio de 2018; 116:60-73.
2. Fleming A. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. affluenza. mayo de 1929;
3. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Accad Sci.* 5 de mayo de 2015;112(18):5649-54.
4. Martínez JL, Coque TM, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol.* Ferrero de 2015;13(2):116-23.
5. Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, Qiao M, Guo GX, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci.* 26 de febrero de 2013;110(9):3435-40.
6. Lavilla Lerma L, Benomar N, Casado Muñoz MDC, Gálvez A, Abriouel H. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic *Pseudomonas* spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. Björkroth J, editor. *Appl Environ Microbiol.* noviembre de 2014;80(21):6792-806.
7. Czekalski N, Sigdel R, Birtel J, Matthews B, Bürgmann H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ Int.* agosto de 2015;81:45-55.
8. Guédron S, Delaere C, Fritz Sherilyn C, Tolu J, Sabatier P, Devel AL, et al. Holocene variations in Lake Titicaca water level and their implications for sociopolitical developments in the central Andes. *Proc Natl Acad Sci.* 10 de enero de 2023;120(2):e2215882120.
9. Flores Quispe MY, Quiñonez Choquecota J. Responsabilidad social y ambiental de las organizaciones sobre la contaminación de la bahía interior del lago Titicaca, Puno. *Cienc Lat Rev Científica Multidiscip.* octubre de 2021;5(5):8270-82.

10. Bhat FA, Yousuf AR, Aftab A, Arshid J, Mahdi MD, Balkhi MH. Ecology and biodiversity in Pangong Tso (lake) and its inlet stream in Ladakh, India. *Int J Biodivers Conserv.* 4 de octubre de 2011;3(10):501-11.
11. Ng C, Tay M, Tan B, Le TH, Haller L, Chen H, et al. Characterization of Metagenomes in Urban Aquatic Compartments Reveals High Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Wastewaters. *Front Microbiol.* 16 de noviembre de 2017; 8:2200.
12. Samson R, Shah M, Yadav R, Sarode P, Rajput V, Dastager SG, et al. Metagenomic insights to understand transient influence of Yamuna River on taxonomic and functional aspects of bacterial and archaeal communities of River Ganges. *Sci Total Environ.* julio de 2019;674:288-99.
13. Tang X, Xie G, Shao K, Dai J, Chen Y, Xu Q, et al. Bacterial Community Composition in Oligosaline Lake Bosten: Low Overlap of *Betaproteobacteria* and *Bacteroidetes* with Freshwater Ecosystems. *Microbes Environ.* 2015;30(2):180-8.
14. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol.* septiembre de 2017;35(9):833-44.
15. Siguayro H, Yerko F. Aspectos fisicoquímicos del lago Titicaca, julio 2019. *Inst Mar Perú.* octubre de 2019;49(4).
16. Coila Añasco PU. Bacterias endofíticas aisladas de Elodea potamogeton (“llachu”) de aguas contaminadas de la bahía interior del Lago Titicaca [Internet]. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2018 [citado 25 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/7058>
17. Zúñiga Vargas AL. Impactos del conflicto socioambiental por aprovechamiento de recursos y ecoturismo en la Reserva Nacional del Titicaca, Puno [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2022 [citado 25 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/5614>
18. Moreno Terrazas E, Argota Pérez G, Centro de Investigaciones Avanzadas y formación Superior en Educación, Salud y Medio Ambiente “AMTAWI”, Alfaro Tapia R, Universidad Nacional del Altiplano, Aparicio Saavedra M, et al. Determinación interactiva de metales totales en las aguas de la bahía interior del

- Lago Titicaca- Puno Perú. Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res [Internet]. 27 de junio de 2017 [citado 25 de octubre de 2023];19(2). Disponible en: <https://huajsapata.unap.edu.pe/index.php/ria/article/view/130>
19. Beltrán Farfán DF, Palomino Calli RP, Moreno Terrazas EG, Peralta CG, Montesinos-Tubée DB. Calidad de agua de la bahía interior de Puno, lago Titicaca durante el verano del 2011. Rev Peru Biol. 31 de diciembre de 2015;22(3):335-40.
 20. EMSA. Plan Maestro Optimizado 2012-2042. 2012.
 21. Gobierno Regional de Puno. Plan De Desarrollo Regional Concertado AL 2021. 2008 may.
 22. Coila Añasco PU, Bernabé Ortiz JC, Ruelas Calloapaza DA. Molecular characterization of endophytic bacteria of *Elodea potamogeton* ("llachu") from Titicaca Lake. Manglar. 30 de septiembre de 2021;18(3):289-94.
 23. Bioaqual. Quinto Informe Nacional Ante El Convenio Sobre La Diversidad Biológica - Años 2010-2013. 2010.
 24. Davies J. Inactivation of Antibiotics and the Dissemination of Resistance Genes. Science. 15 de abril de 1994;264(5157):375-82.
 25. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. Front Microbiol [Internet]. 2011 [citado 27 de octubre de 2023];2. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2011.00203/abstract>
 26. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. Nat Rev Microbiol. marzo de 2007;5(3):175-86.
 27. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. Nature. septiembre de 2011;477(7365):457-61.
 28. Hu Y, Gao GF, Zhu B. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. Front Med. junio de 2017;11(2):161-8.
 29. D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the Antibiotic Resistome. Science. 20 de enero de 2006;311(5759):374-7.

30. Zhuang M, Achmon Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wang H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environ Pollut.* septiembre de 2021;285:117402.
31. Gupta N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *J Cytol.* 2019;36(2):116.
32. Yuan S, Cohen DB, Ravel J, Abdo Z, Forney LJ. Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome. Gilbert JA, editor. *PLoS ONE.* 23 de marzo de 2012;7(3):e33865.
33. Frostegård Å, Courtois S, Ramiisse V, Clerc S, Bernillon D, Le Gall F, et al. Quantification of Bias Related to the Extraction of DNA Directly from Soils. *Appl Environ Microbiol.* diciembre de 1999;65(12):5409-20.
34. Liesack W, Weyland H, Stackebrandt E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb Ecol.* diciembre de 1991;21(1):191-8.
35. Sambrook J, Russell DW. *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006. V, 800 S.
36. Haque KA, Pfeiffer RM, Beerman MB, Struewing JP, Chanock SJ, Bergen AW. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnol.* 2003;
37. PROMEGA. How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? [Internet]. [citado 28 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
38. Seeker LA, Holland R, Underwood S, Fairlie J, Psifidi A, Ilska JJ, et al. Method Specific Calibration Corrects for DNA Extraction Method Effects on Relative Telomere Length Measurements by Quantitative PCR. Criscuolo F, editor. *PLOS ONE.* 10 de octubre de 2016;11(10):e0164046.
39. Pehrsson EC, Tsukayama P, Patel S, Mejía-Bautista M, Sosa-Soto G, Navarrete KM, et al. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature.* 12 de mayo de 2016;533(7602):212-6.

40. Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, et al. Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* octubre de 2005;15(10):1451-5.
41. Yao H, Yiu SM. Deep analysis and optimization of CARD antibiotic resistance gene discovery models. *BMC Genomics.* diciembre de 2019;20(S10):914.
42. ANA. Protocolo nacional para el monitoreo de la calidad de los recursos hídricos superficiales [Internet]. Ministerio de Agricultura y Riego, Perú; 2016 [citado 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.ana.gob.pe/publicaciones/protocolo-nacional-para-el-monitoreo-de-la-calidad-de-los-recursos-hidricos-0>
43. Santella RM. Approaches to DNA/RNA Extraction and Whole Genome Amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 de septiembre de 2006;15(9):1585-7.
44. Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct *de Bruijn* graph. *Bioinformatics.* 15 de mayo de 2015;31(10):1674-6.
45. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 29 de octubre de 2019;gkz935.
46. Evers S, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR (B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol.* marzo de 1996;178(5):1302-9.
47. Schmitzer AR, Lépine F, Pelletier JN. Combinatorial exploration of the catalytic site of a drug-resistant dihydrofolate reductase: creating alternative functional configurations. *Protein Eng Des Sel.* noviembre de 2004;17(11):809-19.
48. Pawlowski AC, Westman EL, Koteva K, Waglechner N, Wright GD. The complex resistomes of Paenibacillaceae reflect diverse antibiotic chemical ecologies. *ISME J.* marzo de 2018;12(3):885-97.
49. Purewal AS. Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* agosto de 1991;82(2):229-32.

50. Kalan L, Ebert S, Kelly T, Wright GD. Noncanonical Vancomycin Resistance Cluster from *Desulfitobacterium hafniense* Y51. *Antimicrob Agents Chemother.* julio de 2009;53(7):2841-5.
51. Nishino K, Inazumi Y, Yamaguchi A. Global Analysis of Genes Regulated by EvgA of the Two-Component Regulatory System in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 15 de abril de 2003;185(8):2667-72.
52. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2014;27(2):241-63.
53. Zhou Q, Su X, Ning K. Assessment of quality control approaches for metagenomic data analysis. *Sci Rep.* 7 de noviembre de 2014;4(1):6957.
54. Batut B, Doyle M, Cormier A, Bretaudeau A, Leroi L, Corre E, et al. Galaxy Training Network. *Galaxy Training Network*; [citado 14 de octubre de 2024]. Quality Control. Disponible en: <https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/sequence-analysis/tutorials/quality-control/tutorial.html>
55. Lienhard A, Schäffer S. Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ.* 12 de abril de 2019;7:e6753.
56. Yang Y, Song W, Lin H, Wang W, Du L, Xing W. Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis. *Environ Int.* julio de 2018;116:60-73.
57. Chen Q, An X, Li H, Su J, Ma Y, Zhu YG. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environ Int.* julio de 2016;92-93:1-10.
58. Archundia D, Duwig C, Lehembre F, Chiron S, Morel MC, Prado B, et al. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Sci Total Environ.* enero de 2017;576:671-82.
59. Vilca FZ, Galarza NC, Tejedó JR, Cuba WAZ, Quiróz CNC, Tornisielo VL. Occurrence of residues of veterinary antibiotics in water, sediment and trout tissue (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern area of Lake Titicaca, Peru. *J Gt Lakes Res.* agosto de 2021;47(4):1219-27.

60. Li N, Li X, Zhang HJ, Fan XY, Liu YK. Microbial community and antibiotic resistance genes of biofilm on pipes and their interactions in domestic hot water system. *Sci Total Environ.* mayo de 2021;767:144364.
61. Rui Y, Qiu G. Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Water Reservoirs and Related Wastewater from Animal Farms in Central China. *Microorganisms.* 16 de febrero de 2024;12(2):396.
62. Li B, Yang Y, Ma L, Ju F, Guo F, Tiedje JM, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME J.* 1 de noviembre de 2015;9(11):2490-502.
63. Zhang H, Li L, Xing Q, Chen J, Fan Y, Dan L, et al. nZnO-based graphene/graphene oxide compounds inhibit methane metabolic pathways and lower the development of antibiotic resistance genes and virulence factors. *J Clean Prod.* noviembre de 2023;428:139413.
64. Wang L, Wang J, Wang J, Zhu L, Conkle JL, Yang R. Soil types influence the characteristic of antibiotic resistance genes in greenhouse soil with long-term manure application. *J Hazard Mater.* junio de 2020;392:122334.
65. Delaney J, Raguideau S, Holden J, Zhang L, Tipper HJ, Hill GL, et al. Impact of trimethoprim on the river microbiome and antimicrobial resistance [Internet]. 2020 jun [citado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.06.05.133348>
66. Cellier-Goetghebeur S, Lafontaine K, Lemay-St-Denis C, Tsamo P, Bonneau-Burke A, Copp JN, et al. Discovery of Highly Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases in Diverse Environmental Settings Suggests an Evolutionary Advantage Unrelated to Antibiotic Resistance. *Antibiotics.* 7 de diciembre de 2022;11(12):1768.
67. Kneis D, Tskhay F, De La Cruz Barron M, Berendonk TU. Bacteria of the order *Burkholderiales* are original environmental hosts of type II trimethoprim resistance genes (*dfrB*). *ISME J.* 8 de enero de 2024;18(1):wrae243.
68. Kneis D, Lemay-St-Denis C, Cellier-Goetghebeur S, Elena AX, Berendonk TU, Pelletier JN, et al. Trimethoprim resistance in surface and wastewater is mediated

- by contrasting variants of the *dfrB* gene. ISME J. 1 de septiembre de 2023;17(9):1455-66.
69. Shintani M, Vestergaard G, Milaković M, Kublik S, Smalla K, Schlöter M, et al. Integrons, transposons, IS elements promote diversification of multidrug resistance plasmids and adaptation of their hosts to antibiotic pollutants from pharmaceutical companies.
70. Hansen LH, Planellas MH, Long KS, Vester B. The Order Bacillales Hosts Functional Homologs of the Worrysome *cfr* Antibiotic Resistance Gene. Antimicrob Agents Chemother. julio de 2012;56(7):3563-7.
71. Tan R, Jin M, Shao Y, Yin J, Li H, Chen T, et al. High-sugar, high-fat, and high-protein diets promote antibiotic resistance gene spreading in the mouse intestinal microbiota. Gut Microbes. 31 de diciembre de 2022;14(1):2022442.
72. Choi A, Nam YH, Baek K, Chung EJ. *Brevibacillus antibioticus* sp. nov., with a broad range of antibacterial activity, isolated from soil in the Nakdong River. J Microbiol. noviembre de 2019;57(11):991-6.
73. McInnes RS, uz-Zaman MH, Alam IT, Ho SFS, Moran RA, Clemens JD, et al. Metagenome-Wide Analysis of Rural and Urban Surface Waters and Sediments in Bangladesh Identifies Human Waste as a Driver of Antibiotic Resistance. Bulman Z, editor. mSystems. 31 de agosto de 2021;6(4):e00137-21.
74. Sheikh SW, Ali A, Ahsan A, Shakoor S, Shang F, Xue T. Insights into Emergence of Antibiotic Resistance in Acid-Adapted Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Antibiotics. 2 de mayo de 2021;10(5):522.
75. Hirakawa H. -Lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 1 de septiembre de 2003;52(4):576-82.
76. Tarek MH, Garner E. A proposed framework for the identification of indicator genes for monitoring antibiotic resistance in wastewater: Insights from metagenomic sequencing. Sci Total Environ. enero de 2023;854:158698.



Anexos 1 Protocolo de extracción de ADN

PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit

Purification of high-quality microbial DNA from microbial culture and transport media samples

Catalog Number A29790

Pub. No. MAN0014332 Rev. A.0

WARNING! Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves. Safety Data Sheets (SDSs) are available from thermofisher.com/support.

Product description

The Invitrogen™ PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit enables fast purification of high-quality microbial and host DNA from a wide variety of sample types. The kit uses proven PureLink™ spin-column technology for robust yields of purified DNA that is ready for downstream PCR, sequencing, or other applications.

Typical DNA recovery is 5–20 µg from 1 mL of microbial culture. For transport media, DNA is recovered in sufficient quantity for downstream PCR detection, but may be undetectable by spectrophotometric methods.

Procedure overview

This guide describes purification of DNA from microbial culture (for example, from single colonies or from broth cultures) or liquid transport media (for example, Amies or Stuart Transport Medium). In this procedure, the microorganisms are efficiently lysed by a combination of heat, chemical, and mechanical disruption with specialized beads. The sample is then applied to a PureLink™ spin column, and the DNA that is bound to the column undergoes a single wash step before elution.

Kit contents

Table 1 PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Cat. no. A29790, 50 reactions)

Component	Quantity	Storage
S1—Lysis Buffer	40 mL	15°C to 30°C
S2—Lysis Enhancer	5 mL	
S3—Cleanup Buffer ^[1]	12.5 mL	
S4—Binding Buffer	45 mL	
S5—Wash Buffer Concentrate ^[2]	13 mL	
S6—Elution Buffer	5 mL	

Component	Quantity	Storage
PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes	50	15°C to 30°C
PureLink™ Collection Tubes	100	
Bead Tubes ^[3]	50	

^[1] Not used in this procedure.

^[2] Add 13 mL of 96–100% ethanol before use. See “Before you begin” on page 2.

^[3] Ships separately.

Required materials

Unless otherwise indicated, all materials are available through thermofisher.com. MLS: Fisher Scientific (www.fisherscientific.com) or other major laboratory supplier.

Table 2 Required materials not included with the kit

Item	Source
Heat block, dry bath, or water bath, 65°C	MLS
[Optional] For dry bath, Lab Armor™ Beads	Cat. no. A12543
Microcentrifuge capable of 14,000 × g	MLS
Vortex mixers, 2 ^[1]	MLS
For vortex bead homogenization: hands-free adapter for vortex mixer, with horizontal tube orientation	Fisher Scientific NC0070788 ^[2]
[Optional; alternative to vortex bead homogenization] Bead mill homogenizer	Omni 19-040, or equivalent
Adjustable pipettors, 100–1000 µL	MLS
Microcentrifuge tubes, DNase-free, 1.5 mL or 2.0 mL	MLS
Ethanol, 96–100%	MLS

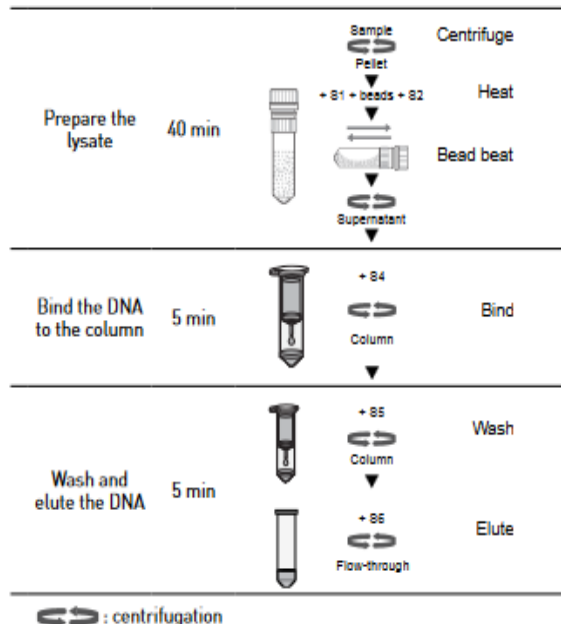
^[1] For vortex bead homogenization: we recommend using two mixers, one dedicated to the hands-free adapter.

^[2] Cat. no. AM10024 (not available for sale) can also be used.

Table 3 Additional materials required for sample volumes >2.0 mL

Item	Source
Conical tubes, 15 mL, DNase-free	Cat. no. AM12500
Benchtop centrifuge for 15-mL conical tubes	MLS

Workflow



Important procedural guidelines

Sample input requirements and handling

- Collect samples according to your laboratory guidelines and experimental needs.
- Recommended input amount:

Sample type	Amount
Microbial culture	0.2–2 mL
Transport media ⁽¹⁾	0.2–5 mL

⁽¹⁾ Swab removed; squeeze swab against the side of the tube before removal to ensure maximal release of cells into the media.

For either sample type, volumes as low as 0.2 mL can be used. For 0.2-mL samples, you may add the sample directly to 600 µL of S1–Lysis Buffer, instead of centrifuging and resuspending the microbial pellet in 800 µL of S1–Lysis Buffer.

- Ensure that samples are mixed thoroughly with S1–Lysis Buffer and S2–Lysis Enhancer to create a homogenous sample.

Alternatives to the optimized procedure

- This procedure is optimized for homogenization by bead beating on the vortex mixer with horizontal agitation. This is a cost-effective method for recovery of high-quality microbial DNA. Ensure that the vortex adapter enables horizontal agitation; adapters with a vertical tube orientation may not agitate adequately.

Note: Balance the vortex adapter to ensure proper movement of the adapter and optimal homogenization.

If you use a bead mill homogenizer, follow the manufacturer's instructions to optimize sample disruption.

- This procedure is optimized for centrifugations at 14,000 × g. The PureLink™ Spin Columns with Collection Tubes can withstand up to 16,000 × g.

If your microcentrifuge is not capable of 14,000 × g, adjust the centrifugation times to ensure that all of the sample passes through the column.

Options for elution

- The DNA can be eluted from the column with 50–200 µL of S6–Elution Buffer, to optimize the concentration of the recovered DNA.
- Two sequential elution steps with S6–Elution Buffer might increase the yield slightly. For example, for a total elution volume of 100 µL, either:
 - Perform two sequential elution steps with 50 µL of S6–Elution Buffer, or
 - Perform the first elution step with 100 µL of S6–Elution Buffer, then apply the flow-through (containing the eluted DNA) to the same column and repeat for a second elution.
- If desired, perform the final elution spin into nuclease-free 1.5-mL microcentrifuge tubes, instead of the collection tubes supplied with the kit, which do not have caps. Position the cap of the microcentrifuge tubes opposite the direction of rotation.

Before you begin

Before first use of the kit: prepare S5–Wash Buffer

Add 13 mL of 96–100% ethanol to S5–Wash Buffer Concentrate, mix well, and store at room temperature.

Before each use of the kit

If precipitate is visible in S1–Lysis Buffer or S4–Binding Buffer, warm the buffers at 37°C for 5 minutes and shake well to dissolve the precipitate.

Methods

Perform the procedure at room temperature (20–25°C), unless otherwise indicated.

-
- 1 Prepare the lysate**
- a. Centrifuge the sample at $14,000 \times g$ for 10 minutes to pellet the microorganisms.
Samples larger than 5 mL may require longer centrifugation times for optimal recovery of microorganisms.
Use an appropriately sized centrifuge tube; do not use a Bead Tube.
 - b. Carefully remove the supernatant and discard.
Avoid disturbing the microbial pellet during this step. Loss of pellet will result in decreased yield.
 - c. Resuspend the microbial pellet in 800 μL of S1—Lysis Buffer, pipet up and down or vortex to resuspend, then transfer the sample to the Bead Tube.
 - d. Add 100 μL of S2—Lysis Enhancer, cap securely, and vortex briefly.
 - e. Incubate at 65°C for 10 minutes.
 - f. Homogenize by bead beating for 10 minutes at maximum speed on the vortex mixer.
Use the hands-free adapter and horizontal agitation.
 - g. Centrifuge at $14,000 \times g$ for 2 minutes.
 - h. Transfer up to 500 μL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube, avoiding the bead pellet and any debris.
-
- 2 Bind the DNA to the column**
- a. Add 900 μL of S4—Binding Buffer, and vortex briefly.
 - b. Load 700 μL of the sample mixture onto a spin column-tube assembly, and centrifuge at $14,000 \times g$ for 1 minute.
 - c. Discard the flow-through, and repeat step 2b with the remaining sample mixture.
-
- 3 Wash and elute the DNA**
- a. Place the spin column in a clean collection tube, add 500 μL of S5—Wash Buffer, then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute.
 - b. Discard the flow-through, then centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 30 seconds.
The second centrifugation optimizes removal of S5—Wash Buffer, which could interfere with downstream applications.
 - c. Place the spin column in a clean tube, add 100 μL of S6—Elution Buffer, then incubate at room temperature for 1 minute.
 - d. Centrifuge the spin column-tube assembly at $14,000 \times g$ for 1 minute, then discard the column.
The purified DNA is in the tube.
- The DNA is ready for immediate use. Alternatively, store the purified DNA:
- At 4°C for up to 1 week.
 - At –20°C for long-term storage.
-

Troubleshooting

Observation	Possible cause	Recommended action
Low yield	Inefficient lysis.	Heat samples at 95°C for 5–10 minutes instead of at 65°C for 10 minutes.
		Heat at 95°C for 5–10 minutes, and bead beat for a longer time or using a higher power setting.
Inhibition of PCR or other downstream reactions	Low levels of DNA in the sample.	Repeat the purification with more starting material. Larger sample volumes may require longer centrifugation times in the initial step to pellet the microorganisms.
	Presence of inhibitors in the recovered DNA.	Dilute the DNA 10- to 100-fold for PCR. Repeat the purification with an additional cleanup step: <ol style="list-style-type: none"> 1. After bead beating and centrifugation, transfer up to 400 μL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube. 2. Add 250 μL of S3–Cleanup Buffer, and vortex immediately. 3. Centrifuge at 14,000 $\times g$ for 2 minutes, then transfer up to 500 μL of the supernatant to a clean microcentrifuge tube, avoiding the pellet. 4. Proceed to “Bind the DNA to the column” on page 3.

Documentation and support

Revision history MAN0014332 (English)

Revision	Date	Description
A.0	September 2015	New document.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER

TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

©2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

For support visit thermofisher.com/support or email techsupport@lifetech.com

thermofisher.com

Anexos 2 Resistoma de la Bahía Interior

gene	drug_class	mechanism	model	contig_coverage_breadth	contig_percent_id
AAC(6)-Ib7	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog	3.0534	100
Bifidobacterium adolescentis rpoB mutants conferring resistance to rifampicin	rifamycin antibiotic	antibiotic target alteration; antibiotic target replacement	protein homolog		
BlaB-20	carbapenem; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	3.2	100
CARB-52	penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.0761	100
EreA2	macrolide antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog		
Erm(50)	macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	2.6515	100

Escherichia coli emrE	macrolide antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	6.3063	100
FIM-1	carbapenem; cephalosporin	antibiotic inactivation	protein homolog	2.6616	100
LHK-6	carbapenem; cephalosporin	antibiotic inactivation	protein homolog	1.7903	100
LRA-8	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.6144	100
LlmA 23S ribosomal RNA methyltransferase	lincosamide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	4.8611	100
MuxC	macrolide antibiotic; monobactam; tetracycline antibiotic; aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	0.7715	100
Nocardia farcinica rox	rifamycin antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog	1.4768	100
OXA-31	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.5271	100
OXA-45	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.2642	100
SHV-123	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	3.69	100

VIM-69	carbapenem; cephalosporin; cephamycin; penam; penem	antibiotic inactivation	protein homolog	3.0075	100
aadS	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog	2.0833	100
adeB	glycylcycline; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	0.6757	100
almG	peptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	2.9197	100
catV	phenicol antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog	7.2727	100
dfrB1	diaminopyrimidine antibiotic	antibiotic target replacement	protein homolog	8.8608	100
ermZ	macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	2.4735	100
mefC	macrolide antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog		
mphG	macrolide antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog		

nalC	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; monobactam; carbapenem; cephalosporin; cephamycin; penam; tetracycline antibiotic; peptide antibiotic; aminocoumarin antibiotic; diaminopyrimidine antibiotic; sulfonamide antibiotic; phenicol antibiotic; penem	antibiotic efflux	protein overexpression	3.7383	100
salE	lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic; streptogramin A antibiotic; pleuromutilin antibiotic	antibiotic target protection	protein homolog	1.4706	100
sdrM	fluoroquinolone antibiotic; disinfecting agents and antiseptics	antibiotic efflux	protein homolog	1.5625	100
tcr3	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	0.9747	100
vanJ	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	2.4169	100
vanT gene in vanN cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	1.1412	100

vanY gene in vanB cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	30.855	50.56
------------------------------	-------------------------	------------------------------------	--------------------	--------	-------



Anexos 3 Resistoma de la Captación Chimú

gene	drug_class	mechanism	model	contig_coverage_breadth	contig_percent_id
APH(3')-IIIa	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	protein homolog	2.6415	100
BRO-1	penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.5478	100
EVM-1	carbapenem	antibiotic inactivation	protein homolog	2.9412	100
GOB-11	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.7304	100
LRA-13	cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolog	2.459	100

MAL-1	carbapenem	antibiotic inactivation	protein homolo g	2.3256	100
MexW	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic; phenicol antibiotic; disinfecting agents and antiseptics	antibiotic efflux	protein homolog		
OCH-6	monobactam; cephalosporin; cephamycin; penam; penem	antibiotic inactivation	protein homolo g	2.046	100
OXA-551	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolo g	2.7027	100
OXA-726	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolo g	3.3962	100
OXA-839	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolo g	2.8986	100
OXA-926	carbapenem; cephalosporin; penam	antibiotic inactivation	protein homolo g	2.6022	100

OprA	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; aminoglycoside antibiotic; carbapenem; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	1.2821	100
POM-1	carbapenem	antibiotic inactivation	protein homolog	2.439	100
RbpA	rifamycin antibiotic	antibiotic target protection	protein homolog		
Staphylococcus aureus LmrS	macrolide antibiotic; aminoglycoside antibiotic; oxazolidinone antibiotic; diaminopyrimidine antibiotic; phenicol antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	1.4553	100
TLA-3	fluoroquinolone antibiotic; monobactam; cephalosporin	antibiotic inactivation	protein homolog	2.2581	100
adeC	glycylcycline; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	1.2876	100
adeJ	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; lincosamide antibiotic; carbapenem; cephalosporin; tetracycline antibiotic; rifamycin	antibiotic efflux	protein homolog	0.8499	100

	antibiotic; diaminopyrimidine antibiotic; phenicol antibiotic; penem				
almG	peptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolo g	2.5547	100
amrA	aminoglycoside antibiotic	antibiotic efflux	protein homolo g	2	100
eptB	peptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolo g	1.2174	100
erm(32)	macrolide antibiotic; lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolo g	2.4911	100
evgA	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; penam; tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolo g	4.3902	100
lsaC	lincosamide antibiotic; streptogramin antibiotic; pleuromutilin antibiotic	antibiotic target protection	protein homolo g	1.6227	100

mdsA	monobactam; carbapenem; cephalosporin; cephamycin; penam; phenicol antibiotic; penem	antibiotic efflux	protein homolo g	1.7115	100
mdsB	monobactam; carbapenem; cephalosporin; cephamycin; penam; phenicol antibiotic; penem	antibiotic efflux	protein homolo g	0.6629	100
mdtA	aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	protein homolo g	1.4423	100
mexM	phenicol antibiotic	antibiotic efflux	protein homolo g	1.5544	100
msrH	macrolide antibiotic; streptogramin antibiotic	antibiotic target protection	protein homolo g	1.6427	100
qacEdelta1	disinfecting agents and antiseptics	antibiotic efflux	protein homolog		
rpoB2	rifamycin antibiotic	antibiotic target alteration; antibiotic	protein homolog		

		target replacement			
smeF	macrolide antibiotic; fluoroquinolone antibiotic; tetracycline antibiotic; phenicol antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	1.2848	100
tet(44)	tetracycline antibiotic	antibiotic target protection	protein homolog	0.936	100
tet(K)	tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	protein homolog	1.7391	100
vanT gene in vanE cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	1.2802	100
vanW gene in vanI cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	20.5882	33.77
vanXY gene in vanG cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolog	3.1373	100

vanY gene in vanB cluster	glycopeptide antibiotic	antibiotic target alteration	protein homolo g	42.7509	32.76
------------------------------	-------------------------	------------------------------------	------------------------	---------	-------



Anexos 4 Registro fotográfico



Recolección de muestra en la
captación Chimu



Recolección de muestra en la bahía
interior



Filtración de las muestras recolectadas



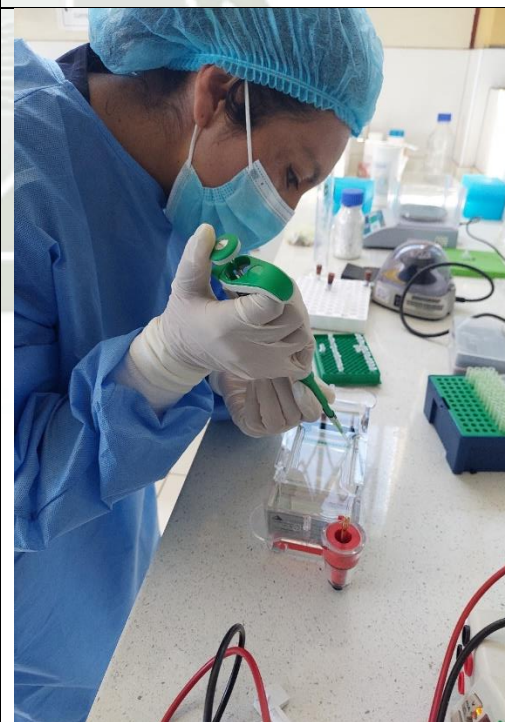
Uso del kit de extracción de ADN



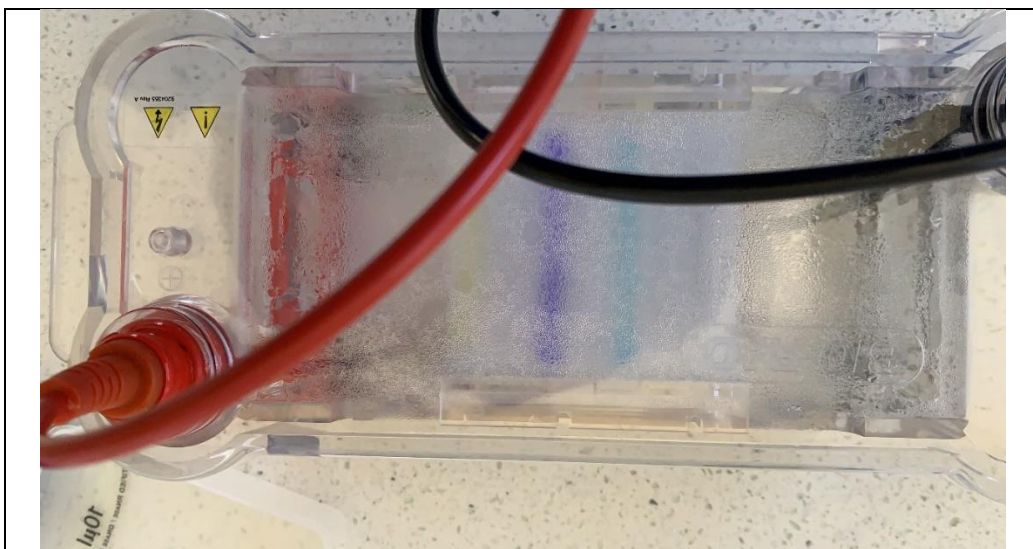
Evaluación de la cantidad y calidad de ADN por medio de espectrofotometría



Preparación de geles de agarosa para la evaluación de la integridad por electroforesis horizontal



Aplicado de muestra en geles de agarosa del ADN extraído



Electroforesis horizontal con muestras de ADN extraído

