

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ÁNDRES

FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOLOGÍA



TESIS DE MAESTRÍA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS.**

**“RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y DIVERSIDAD MICROBIANA EN
AMBIENTES ACUÁTICOS IMPACTADOS POR LA ACTIVIDAD MINERA, EN
LOS ANDES DE BOLIVIA”**

ELABORADO POR: Jorge Israel Agramont Sanjines

TUTOR: Carla Calderón Toledo PhD.

CO-TUTOR Sergio Mauricio Gutiérrez PhD.

ASESOR: Enrique Joffre PhD.

LA PAZ-BOLIVIA

2021

**FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE BIOLOGÍA**

Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias Biológicas

Título:

**“RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y DIVERSIDAD MICROBIANA EN
AMBIENTES ACUÁTICOS IMPACTADOS POR LA ACTIVIDAD MINERA, EN
LOS ANDES DE BOLIVIA”**

Elaborado por: Lic. Jorge Israel Agramont Sanjines

TUTOR:

Carla Calderón Toledo PhD.

CO-TUTOR:

Sergio Mauricio Gutiérrez PhD.

TRIBUNALES:

Isabel Morales Belpaire PhD.

Darío Acha Cordero PhD.

JEFE DE CARRERA:

Abul Kalam Kurban PhD.

La Paz, Noviembre 2021

Dedicado a mi familia, Magda, Jorge, Muffin, Lucky, Mila y Danilo.

En las encrucijadas *.

Estoy en deuda con un gran numero de personas que hicieron esto posible. En especial quiero dar las gracias a mi tutora y co-tutor, Carla Calderon y Sergio Gutierrez, por todas sus enseñanzas y la confianza que pusieron en mi.

A mis tribunales, la Dra. Isabel Morales y el Dr. Darío Achá, por sus palabras de aliento y sus obervaciones enriquecedoras.

Estoy en una deuda infinita con la Dra. Åsa Sjöling, por haber abierto las puertas de su laboratorio en Karolinska Institutet y el CTMR para mí, siempre recordare su hospitalidad. Estoy en deuda también con mi asesor de tesis Enrique Joffre, muchas gracias por inspirarme a seguir adelante y perseguir mis sueños y metas, y por todas tus enseñanzas.

A la Dra. Volga Iñiguez, por haber abierto las puertas el IBMB para mi y haberme dado la oportunidad de sumergirme en los nobles campos de la biología molecular. A mis amigos y compañeros en el IBMB, en especial a Leo, Christian, Sonia, Eli, Alejandra, Julia, a Jessica, al Lic. Nata y a Doña Vicky.

A mis amigas y compañeras de la maestria, en especial a Ceci y a Joely. A mis compañeros de la carreda de Biología y a mis queridas amigas Noe, Vivi, Nayra, Vale, Carlita, Lucia, Nelsy, Yara, Violeta, y Sarita.

A toda mi familia, en especial a mi prima Ariana por su ayuda con el mapa del sitio de estudio incluido en esta tesis. A mi mamá y a mi papá por su apoyo constante y a mis peluditos Muffin y Lucky, por tantas caminatas que me ayudaron a poner en orden mis ideas.

Finalmente, a todos aquellos que están por venir, asi como a todos aquellos que ya no están. A todos gracias por acompañarme en este largo trayecto, el viaje fue muy grato gracias a ustedes.

Contenido

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Resistencia a Antibióticos y Genes de Resistencia a Antibióticos..... | 1 |
| La resistencia a Antibióticos y los Ecosistemas Acuáticos..... | 2 |
| Metales pesados y Genes de Resistencia a Antibióticos..... | 3 |
| Contaminación fecal y Genes de Resistencia a Antibióticos..... | 3 |
| Comunidades Bacterianas y Genes de Resistencia a Antibióticos..... | 4 |
| Relación entre la contaminación por metales pesados y descargas fecales en la abundancia de Genes de Resistencia a Antibióticos..... | 5 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 6 |
| Sitios de muestreo | 6 |
| El valle de Milluni..... | 6 |
| El lago Uru Uru..... | 6 |
| Recolección de muestras y procesamiento..... | 7 |
| Cuantificación de Metales..... | 9 |
| Extracción de ADN..... | 9 |
| PCR Cuantitativo | 10 |
| Análisis microbiológicos..... | 12 |
| Estimación de Coliformes totales y <i>Escherichia coli</i> | 12 |
| Recuperación y aislamiento de microorganismos | 13 |
| Caracterización fenotípica y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana..... | 13 |
| Pruebas de difusión de disco Kirby-Bauer..... | 14 |
| Secuenciación metagenómica | 15 |
| Análisis estadístico..... | 16 |
| RESULTADOS..... | 17 |

| | |
|---|----|
| Condiciones fisicoquímicas y niveles de metales pesados..... | 17 |
| Detección y cuantificación de GRAs y EGMs..... | 21 |
| Evaluación de la Composición de las comunidades microbianas en agua y sedimentos. | 25 |
| Contaminación fecal y GRAs..... | 29 |
| Análisis microbiológico de aguas residuales y resistencia fenotípica a antibióticos. | 34 |
| DISCUSIÓN | 40 |
| CONCLUSIONES | 48 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| ANEXOS..... | 55 |

Índice de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Área de estudio..... | 8 |
| Figura 2. Constructo de blancos de PCR..... | 11 |
| Figura 3. Parámetros fisicoquímicos..... | 18 |
| Figura 4. Niveles de metales en los sedimentos..... | 19 |
| Figura 5. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros ambientales de los sitios de muestreo..... | 20 |
| Figura 6. Matriz de correlaciones entre metales y parámetros fisicoquímicos..... | 21 |
| Figura 7. Abundancia normalizada de GRA, intl1 y CrAssphage detectados en sedimentos y aguas..... | 23 |
| Figura 8. Correlaciones entre los genes cuantificados..... | 24 |
| Figura 9. Diversidad de las comunidades microbianas. a..... | 26 |
| Figura 10. Composición de las comunidades microbianas a nivel de género..... | 28 |
| Figura 11. Abundancia de GRAs e intl1 en función a la presencia de crAssphage..... | 30 |
| Figura 12. Relación entre variables ambientales y la abundancia de intl1 y GRAs..... | 32 |
| Figura 13. Relación entre composición de la comunidad microbiana, abundancia de genes y variables ambientales..... | 33 |
| Figura 14. Presencia y densidad de coliformes totales y E. coli..... | 35 |
| Figura 15 Dendrograma de las cepas E. coli aisladas de las muestras de aguas residuales..... | 37 |
| Figura 16. Resultados de los ensayos de difusión de discos Kirby-Bauer..... | 40 |

Índice de Tablas

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Cebadores empleados para la cuantificación de genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)..... | 11 |
|---|-----------|

Resumen

El incremento en la abundancia de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) en ambientes acuáticos se ha relacionado a la contaminación ambiental. Sitios contaminados con altas concentraciones de metales podrían favorecer la co-selección in situ de GRAs, mientras que las descargas de aguas residuales liberan gran cantidad de bacterias fecales resistentes a antibióticos en el ambiente. Para estudiar el efecto de la contaminación fecal humana y la polución por actividades mineras, se colectaron muestras de agua y sedimentos de tres lagos afectados por descargas de aguas residuales, y actividades mineras en Bolivia, Patakhota considerado un lago prístino, Milluni Chico, un lago directamente impactado por drenajes ácidos de mina, y Uru Uru, un lago localizado a las afueras de la ciudad de Oruro altamente contaminado por actividades mineras y descargas de aguas residuales de la ciudad. Se analizaron los parámetros fisicoquímicos y niveles de metales de las muestras de agua y sedimentos colectados. Se cuantificaron GRAs, el elemento genético móvil integron de clase 1 (*intl1*) y el marcador de contaminación fecal humana crAsspahe, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). El gen *intl1* mostró correlaciones positivas con *sul1*, *sul2*, *tetA*, y *bla_{OXA-2}*. El marcador CrAsspahe solo se detectó en el lago Uru Uru y sus tributarios, estos sitios presentaron una abundancia significativamente mayor de GRAs. Análisis multivariantes mostraron que la abundancia de crAsspahe, la conductividad eléctrica y el pH presentaron correlaciones positivas con *intl1* y los GRAs. Los análisis microbiológicos basados en cultivo mostraron que el canal Tagarete que descargas las aguas residuales de la ciudad de Oruro presento los niveles más altos de coliformes totales y *Escherichia coli*, así como los valores más altos en el índice Resistencia antibióticos múltiple (MAR). Juntos, nuestros resultados sugieren que la contaminación fecal es el factor principal que contribuye al incremento de los GRAs y el gen *intl1* en los ambientes contaminados por aguas residuales y actividades mineras.

Abstract

An increased abundance of antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environments has been linked to environmental pollution. Mining polluted sites with high concentrations of metals could favor the *in situ* co-selection of ARGs, whereas wastewater discharges release fecal antibiotic resistant bacteria in the environment. To study the effect of human fecal contamination and mining pollution, water and sediment samples affected by mining activities and sewage discharges were collected from three lakes in Bolivia, the pristine Andean lake Pata Khota, the Milluni Chico lake directly impacted by acid mine drainage, and the Uru-Uru lake located close to Oruro city and highly polluted by mining activities and human wastewater discharges. Physicochemical parameters, including metal levels, were analyzed in water and sediment samples. ARGs were screened by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) together with the mobile element class 1 integron (*intl1*), as well as crAssphage, a marker of human fecal pollution. The gene *intl1* was positively correlated with *sul1*, *sul2*, *tetA*, and *bla_{OXA-2}*. CrAssphage was only detected in the Uru-Uru lake, and its tributaries and a significantly higher abundance of ARGs were found in these sites. Multivariate analysis showed that crAssphage abundance, electrical conductivity, and pH were positively correlated with higher levels of *intl1* and ARGs. Culture-based microbial analysis showed that the total coliform bacteria and *Escherichia coli* presented the highest abundance in the Tagarete Chanel, and the higher values in the Multiple Antibiotic Resistance index. Taken together, our results suggest that fecal pollution is the major driver of higher levels of ARGs and *intl1* in environments contaminated by wastewater and mining activities.

INTRODUCCIÓN

Resistencia a Antibióticos y Genes de Resistencia a Antibióticos.

La habilidad de las bacterias de resistir los efectos de los antibióticos se denomina resistencia a antibióticos, las bacterias que poseen o adquieren dicha habilidad se denominan Bacterias Resistentes a Antibióticos (BRAs) (Amarasiri *et al.* 2020). La resistencia a antibióticos es considerada una de las más grandes amenazas a la salud humana a escala global (Llor & Bjerrum 2014). Cada año se reportan más de 2.8 millones de infecciones causadas por BRAs y más de 35 000 personas mueren como consecuencia de dichas infecciones, tan solo en los Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services 2019). Actualmente las infecciones por microorganismos que no pueden ser tratadas con ningún antibiótico disponible cada vez son más frecuentes, por lo cual se considera que hemos entrado a la era post antibióticos (U.S. Department of Health and Human Services 2019).

Las bacterias adquieren la capacidad de resistir a los antibióticos ya sea mediante mutaciones genómicas (por ejemplo, mutaciones en los blancos de los antibióticos que afectan las interacciones entre el antibiótico y su blanco), o mediante transferencia horizontal de genes, mecanismo por el cual una célula adquiere genes que le confieren funciones nuevas (por ejemplo, enzimas que inactivan antibióticos) (Culyba *et al.* 2015). Los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes son: i) conjugación, mecanismo en el cual las células donantes y receptoras entran en contacto mediante adhesinas o *pili* para la transferencia del material genético; ii) transformación, que consiste en la adquisición de ADN extracelular, que se integra y expresa en una bacteria; iii) transducción, mecanismo mediado por virus, principalmente bacteriófagos. Todos estos mecanismos de transferencia horizontal de genes son responsables de la diseminación de genes de resistencia a antibióticos (GRAs) desde bacterias ambientales y comensales, reservorios de GRAs que son denominadas como el resistoma, hacia bacterias patogénicas (von Wintersdorff *et al.* 2016).

Los Genes de Resistencia a Antibióticos y los Elementos Genéticos Móviles (EGMs) que cargan estos genes son denominados contaminantes xenogénicos i.e. elementos que pueden ser incorporados en los genomas de microorganismos incrementando sus

concentraciones mediante la replicación de sus hospederos (Gillings *et al.* 2018), son también clasificados como contaminantes emergentes de ambientes acuáticos, donde pueden ser adquiridos por patógenos, generando problemas de salud pública (Berendonk *et al.* 2015).

La resistencia a Antibióticos y los Ecosistemas Acuáticos.

La microbiota humana y animal es un reservorio de GRAs, que pueden pasar a las bacterias que transitan el tracto intestinal y terminan en las heces y estas a su vez en aguas residuales (Amarasiri *et al.* 2020). En plantas de tratamiento de aguas residuales convergen altas densidades microbianas, además de sustancias químicas, antibióticos y metales que favorecen la transferencia horizontal de genes (Karkman *et al.* 2018). Los efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales contiene GRAs y EGMs que terminan en los sedimentos de los cuerpos de agua receptores (Chu *et al.* 2018). A lo largo de la costa oriental China, en 18 estuarios analizados, los GRAs en sedimentos están fuertemente correlacionados con EGMs y con residuos de antibióticos (Zhu *et al.* 2017). Las comunidades acuáticas bacterianas expuestas a metales y antibióticos presentan mayor abundancia de integron de clase 1 (*intl1*) un EGM, sugiriendo mayor potencial de transferencia horizontal de genes (Wright *et al.* 2008). Las comunidades microbianas acuáticas provenientes de aguas residuales al ser expuestas a niveles bajos de antibióticos y biocidas (los desinfectantes triclosán y clorhexidina) son capaces de transferir GRAs mediante conjugación (Jutkina *et al.* 2018). Muchos GRAs encontrados en patógenos humanos también son encontrados en bacterias ambientales no patogénicas, muchas veces flanqueados de EGMs, es decir, estos genes se movilizan mediante transferencia horizontal entre el medio ambiente y los entornos hospitalarios. (Marti *et al.* 2014, Nesme *et al.* 2014).

Fabricas productoras de antibióticos en India descargan alrededor de 45 kg de ciprofloxacina al día (Larsson *et al.* 2007), la descarga de estas aguas residuales impacta fuentes de agua superficial, subterránea y potable en la zona, donde la concentración de ciprofloxacina puede llegar hasta los 14 mg/L (Fick *et al.* 2009), como consecuencia, la planta de tratamiento de aguas residuales que recibe dichas descargas presenta muy altas proporciones de microorganismos multirresistentes (Marathe *et al.* 2013) y en los sitios aledaños se detectaron niveles muy elevados de GRAs y EGMs (Kristiansson *et al.* 2011).

Los antibióticos descargados en ambientes acuáticos actúan como presión selectiva que promueve la selección de microorganismos que cargan GRAs y EGMs, y la transferencia horizontal de genes, favoreciendo la diseminación de estos elementos.

Metales pesados y Genes de Resistencia a Antibióticos.

Otra actividad antropogénica que causa un impacto ambiental significativo es la minería. Estas actividades contaminan los cursos de agua con metales disueltos (Navarro *et al.* 2008), ocasionando que los metales pesados se acumulen en los sedimentos (Liu *et al.* 2019). Se ha sugerido que los metales pesados favorecen la selección de GRAs por procesos de co-selección, i.e. la adquisición simultánea de GRAs y genes de resistencia a metales (GRMs), donde la presión selectiva es ejercida por la presencia de metales (Baker-Austin *et al.* 2006). Diversos estudios reportan esta relación. Un estudio realizado en Irlanda del Norte analizó muestras de suelo urbano y determinó la presencia de metales (Zn, Cu, Cd, Co, Ni, Hg, Cr y As) y varios GRAs asociados a EGMs (Zhao *et al.* 2019). Igualmente otro estudio en el río Dongying en China, demostró que los niveles de Cu y Cr y la abundancia de diferentes GRAs mostraron una correlación positiva (Zhao *et al.* 2016). Los niveles de Zn y Pb mostraron correlación positiva con la abundancia de genes de resistencia a eritromicina en plantas de tratamiento de aguas residuales (Gao *et al.* 2015). Estos datos indican que la presencia de metales pesados favorece la selección de GRAs y EGM, y que los ambientes acuáticos son importantes para la ecología y evolución de la resistencia a antibióticos. En particular, los cuerpos de agua pueden ser *hotspots* para la evolución de GRAs dado que en estos convergen antibióticos, microorganismos de diferentes fuentes, biocidas, y metales pesados (Taylor *et al.* 2011, Karkman *et al.* 2018), lo que genera un escenario que favorece la emergencia, persistencia y diseminación de GRAs (Baquero *et al.* 2008).

Contaminación fecal y Genes de Resistencia a Antibióticos.

Las bacterias intestinales expuestas a grandes concentraciones de antibióticos son una de las principales fuentes de GRAs y EGMs (Amarasiri *et al.* 2020), estas bacterias son liberadas al ambiente mediante la descarga de aguas residuales en las que las descargas fecales convergen con antibióticos, metales y otras sustancias químicas. En lagos urbanos como Xochimilco México, aguas residuales semitratadas y no tratadas son descargadas,

incrementando la concentración de bacterias fecales principalmente en los sedimentos, donde también se encontraron los mayores niveles de bacterias resistentes a antibióticos (Rosas *et al.* 2015), sugiriendo una relación entre las descargas fecales y la resistencia a antibióticos.

Los niveles de contaminación fecal no son frecuentemente considerados en el análisis de selección y diseminación de GRAs (Karkman *et al.* 2019). La incorporación de un marcador molecular de contaminación fecal humana puede ayudarnos a discernir entre la acumulación de GRAs debido a descargas fecales y la selección *in situ* y diseminación de GRAs causada por otros contaminantes ambientales (Karkman *et al.* 2019). El bacteriófago crAssphage (Cross-Assembly phage), que probablemente infecta *Bacteroides* uno de los géneros de bacterias Gram-negativas más abundante en la microbiota intestinal humana (Dutilh *et al.* 2014), es altamente abundante en ambientes acuáticos contaminados por heces humanas, y poco frecuente en ambientes acuáticos contaminados por heces de otros animales (García-Aljaro *et al.* 2017); por lo que crAssphage es considerado un marcador de contaminación fecal humana. El marcador crAssphage mostró correlación positiva con la abundancia de GRAs que confieren resistencia a macrólidos, tetraciclinas y sulfonamidas, en aguas de arroyos urbanos (Stachler *et al.* 2019), relacionando la contaminación fecal en el agua y la presencia de GRAs.

Comunidades Bacterianas y Genes de Resistencia a Antibióticos.

Las descargas de antibióticos en el ambiente ejercen presiones selectivas sobre las comunidades microbianas de aguas y sedimentos, influenciando a su vez la presencia y abundancia de GRAs (Deng *et al.* 2020). Diversos estudios hallaron correlaciones significativas entre la composición de las comunidades bacterianas y la composición de GRAs (Zhou *et al.* 2017, Chen *et al.* 2019, Deng *et al.* 2020), la composición de las comunidades microbianas es considerada determinante del resistoma en el suelo (Forsberg *et al.* 2014). Las descargas fecales urbanas impactan las comunidades bacterianas acuáticas disminuyendo su diversidad, favoreciendo ciertos grupos bacterianos como Proteobacteria, Firmicutes, y Bacteroidetes sobre otros (Paruch *et al.* 2019), estos mismos filos presentaron mayor abundancia en sedimentos fuertemente impactados por metales pesados, presentando también mayor variedad de genes de resistencia a metales (Chen *et al.* 2018). Dentro de estos

filos se encuentran miembros importantes del microbioma intestinal humano, por ejemplo: *Escherichia coli* una Proteobacteria, *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* pertenecientes al fílum Firmicutes, el género *Bacteroidales* miembro del fílum Bacteroidetes (Paruch *et al.* 2019).

Relación entre la contaminación por metales pesados y descargas fecales en la abundancia de Genes de Resistencia a Antibióticos.

Desde hace siglos las actividades mineras son económicamente importantes en la región andina de Bolivia, e impactan severamente los recursos hídricos (Garrido *et al.* 2017, Quaghebeur *et al.* 2019) mediante la descarga de drenajes ácidos de minas, aguas altamente acidas, con altas concentraciones de metales pesados y sulfatos. Esta región también sufre de escases de agua debido a los efectos adversos del cambio climático sobre los glaciares tropicales (Satgé *et al.* 2019). Además, las aguas residuales de sus ciudades son descargadas directamente al ambiente, contaminando el agua con patógenos entéricos, antibióticos, y bacterias resistentes a antibióticos (Poma *et al.* 2016, Archundia *et al.* 2017, Guzman-Otazo *et al.* 2019). Niveles muy altos de antibióticos causan una selección evidente de GRAs en aguas residuales (Karkman *et al.* 2019). Sin embargo, para nuestro conocimiento no existen estudios previos acerca de la abundancia de GRAs en ambientes con niveles muy altos de metales y descargas de aguas residuales.

Este trabajo tuvo por objetivo analizar la relación de la contaminación por metales y las descargas fecales humanas en la abundancia de diferentes GRAs, el integrón de clase 1 (*intl1*), en agua y muestras de sedimentos de lagos prístinos, contaminados por minería y contaminados por aguas servidas y descargas mineras, para explorar las contribuciones de metales y descargas fecales en la abundancia de GRAs, El integrón de clase 1 es el integrón más abundante y más ampliamente distribuido entre bacterias (Stalder *et al.* 2012) y es considerado un gen marcador de contaminación antropogénica, comúnmente ligado con genes de resistencia a antibióticos y metales en bacterias Gram-negativas (Gillings *et al.* 2015). Parámetros fisicoquímicos y niveles de metales fueron medidos. Los análisis de metales incluyeron elementos que previamente fueron reportados en el área de estudio (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008, Alanoca *et al.* 2016) y que se sabe tiene efectos de co-

selección de resistencia a antibióticos (Stepanauskas *et al.* 2006, Graham *et al.* 2011, Knapp *et al.* 2011, Gullberg *et al.* 2014, Gao *et al.* 2015, Kang *et al.* 2018).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

El valle de Milluni

Localizado en la región andina de Bolivia, en el departamento de La Paz a 20 Km de la ciudad de La Paz, en la Cordillera Real. Es un valle glaciar a los pies de la montaña Huayna Potosí. El valle tiene cuatro lagunas: Pata Khota (4670 msnm), Jankho Khota (4575 msnm), Milluni Chico (4540 msnm), y Milluni Grande (4530 msnm), la más grande, con una superficie de 2.37 Km² y una profundidad de 4 m. Milluni Grande tiene una represa que captura y distribuye agua a la planta de tratamiento de agua potable de Achachicala, el agua es distribuida a las ciudades de La Paz y El Alto.

Las actividades mineras en el valle de Milluni se desarrollaron desde 1920 hasta 1986. Agua de las lagunas aledañas era utilizada para las actividades mineras. Los drenajes ácidos de mina fueron descargados directamente a la laguna de Milluni Chico, contaminando también la laguna de Milluni Grande. Como consecuencia estos dos lagos adquirieron un pH extremadamente ácido que favoreció la movilidad de metales (Cd, Zn, As, Cu, Ni, Pb, Sn) en el agua y los sedimentos (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008). En contraste, la primera laguna, Pata Khota, recibe agua de deshielo del nevado Huayna Potosí. Otras actividades antropogénicas en el sitio son mínimas y la laguna es considerada según algunos estudios como un ambiente ecológicamente intacto (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008, Driesen 2012).

El lago Uru Uru

El lago Uru Uru (3686 msnm), situado en el departamento de Oruro, en la parte central del Altiplano boliviano, es un lago artificial poco profundo ubicado a 8 Km al sur de la ciudad de Oruro. El lago se caracteriza por un pH alcalino (8.3 ± 0.6) con fuerte capacidad tampón. El canal Tagarete recibe y descarga aguas servidas no tratadas de la ciudad de Oruro a la parte norte del lago. La parte Noreste del lago Uru Uru recibe descargas de aguas residuales de la mina de San José y la planta de fundición Vinto

(Alanoca *et al.* 2016). Por otra parte, el río Desaguadero, que viene desde el lago Titicaca, drena las descargas de Kori Kollo y Kori Chaca (dos lagos meromítico que antiguamente fueron minas de oro a cielo abierto). Las descargas son drenadas en la parte Noroeste del lago (Zamora Echenique *et al.* 2018). Estudios previos en Uru Uru reportaron que la contribución de desechos mineros y aguas residuales incrementaron la conductividad eléctrica la concentración de metales y metaloides como el Hg, Fe, Mn, W, y Sb (Alanoca *et al.* 2016).

Recolección de muestras y procesamiento

Las muestras de Milluni fueron colectadas durante la época seca en Julio del 2016. Tres puntos fueron seleccionados al azar en las lagunas de Milluni Chico y Pata Khota como se indica en la Figura 1. La conductividad eléctrica (CE) y el pH fueron medidos directamente en el agua (Oakton Instruments, Vernon Hills). Se colectaron muestras de sedimentos por duplicado en tubos de centrifuga estériles para la posterior extracción de ADN y la cuantificación de metales. Las muestras fueron etiquetadas e inmediatamente guardadas a 4 °C con packs fríos y transportadas de manera inmediata al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Biología Molecular y Biotecnología (IBMB) de la Universidad Mayor de San Andrés, donde fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de su análisis.

Las muestras de Uru Uru y sus tributarios fueron colectadas durante la época húmeda (noviembre 2018). Tres puntos distintos fueron considerados (Figura 1): (1) UP1: El canal que descarga las aguas del lago meromítico de Kori Chaca, en la parte noroeste del lago Uru Uru. Existen actividades agrícolas alrededor de este canal. (2) UP2: El canal Tagarete que descarga las aguas servidas de la ciudad de Oruro; y (3) UP3: un punto localizado en la parte noreste del lago donde desembocan las descargas del canal Tagarete.

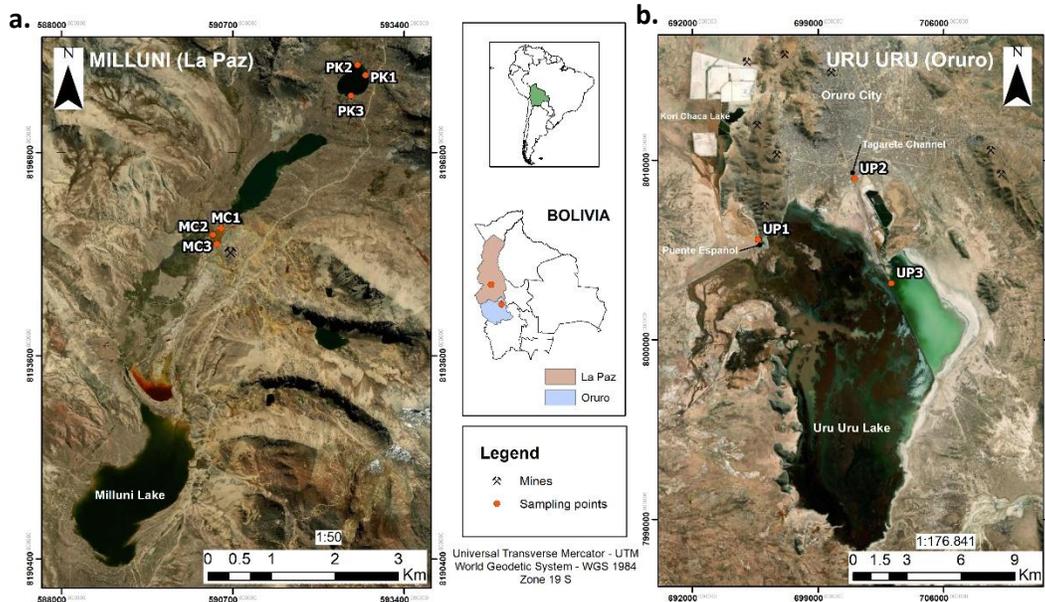


Figura 1. Área de estudio. **a.** sitios de muestreo dentro del Valle de Milluni, en el departamento de La Paz. Tres sitios de muestreo fueron seleccionados en las lagunas de Pata Khota (PK) y Milluni Chico (MC). La mina “La Fabulosa” se ubica aldeaña a la laguna Milluni Chico. **b.** sitios de muestreo en el lago Uru Uru, en el departamento de Oruro: UP1 localizado en un canal que descarga las aguas del lago meromórfico de Kori Chaca una antigua mina de oro a cielo abierto, UP2 se localiza en el canal Tagarete que drena las descargas de aguas residuales no tratadas de la Ciudad de Oruro al lago Uru Uru, y UP3 localizado en la parte noreste del lago donde convergen descargas mineras y aguas residuales.

Las muestras de sedimento fueron colectadas en triplicado. El pH y la CE fueron medidos *in situ* en el agua. Las muestras de sedimento fueron colectadas en tubos de centrifuga estériles de 50 mL, con ayuda de un muestreador de sedimentos cilíndrico. Las muestras fueron divididas en dos fracciones, una para la extracción de ADN y la otra para la cuantificación de metales. Las muestras se colocaron a 4 °C con packs fríos y fueron transportadas al laboratorio en la ciudad de La Paz, donde fueron almacenadas a -70 °C hasta el momento de su análisis. También se recolectaron 300 mL de muestras de agua superficial en triplicado, y almacenadas en botellas plásticas estériles por cada punto por

duplicado. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio para ser filtrada a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Sigma-Aldrich). Los filtros fueron inmediatamente almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. El resto de muestra de agua fue empleada para la estimación de coliformes totales y *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante fermentación en tubos múltiples y Numero Mas Probable (NMP) (explicado posteriormente).

Cuantificación de Metales

Seis elementos (As, Pb, Cu, Cd, Zn, y Ni [mg/Kg]) fueron cuantificados en las muestras de sedimentos y de agua. Los análisis anteriormente descritos (Guedron *et al.* 2017) fueron realizados en el Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA) de la Universidad Mayor de San Andrés mediante espectroscopia de absorción atómica.

Extracción de ADN

El ADN de las muestras de sedimentos fue extraído a partir de 300 mg de muestra empleando el kit de extracción *PowerSoil ADN isolation kit* (Qiagen, Alemania). Debido al bajo pH y la presencia de metales pesados, previamente las muestras fueron sometidas a un prelavado con una solución S0 (0.1 M EDTA, 0.1 M Tris (pH 8.0), 1.5 M NaCl, 0.1 M NaH_2PO_4 , y Na_2HPO_4) (Fang *et al.* 2015). Brevemente, 300 mg de sedimentos fueron lavados con 1.5 mL de solución S0 toda la noche en un agitador horizontal a 180 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el sedimento fue recuperado por centrifugación a $12,000 \times g$ por 5 minutos, el sobrenadante fue desechado y el pellet resuspendido en 1.5 mL de solución S0, el procedimiento se fue repitiendo varias veces hasta que se obtuvo un sobrenadante claro. Los sedimentos fueron trasferidos a los *PowerBead Tubes* (Qiagen, Alemania) y la extracción procedió siguiendo las instrucciones del fabricante, el ADN fue eluido en un volumen final de 100 μL de agua ultra pura libre de DNAsa.

Un cuarto de los filtros de nitrocelulosa fue utilizado para la extracción de ADN, usando el kit *PowerSoil ADN isolation kit* (Qiagen, Alemania). Los filtros fueron cortados y trasferidos a los *PowerBead Tubes* (Qiagen, Alemania) y la extracción de DNA de la biomasa microbiana atrapada en el filtro procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN obtenido fue medida por fluorescencia empleando el kit *Qubit dsADN HS* (Invitrogen, OR, USA).

PCR Cuantitativo

En un estudio anterior (Agramont 2018) el kit *Antibiotic Resistance Genes Microbial ADN qPCR arrays* (Qiagen, Velncia, CA, USA), fue usado para realizar un screening de GRAs presentes en las lagunas de Milluni. Los arrays consisten en placas de 96 pocillos que contienen cebadores y sondas predispensadas para la detección de 85 GRAs diferentes. Para este estudio fueron considerados todos los genes con al menos un resultado positivo ($CT < 39$) en los arrays. Basados en los resultados del screening fueron seleccionados 12 GRAs: β -lactamasas (*acc-3*, *bla_{IMP-2}*, *bla_{IMP-5}*, *bla_{IMP-12}*, y *bla_{OXA-2}*), macrólidos-licosamida-estreptogramina B (*msrA*), meticilina (*mecA*), quinolonas (*qnrB1*, *qnrB5*, y *qnrS1*), tetraciclina (*tetA* y *tetB*); además, se incluyeron los genes de resistencia a sulfonamidas (*sul1* y *sul2*) no incluidos en el array, pero detectados en estudios previos en Milluni (Archundia *et al.* 2017).

Para generar la curva estándar para la cuantificación absoluta de estos genes, se ensamblaron las secuencias blanco de los 14 GRAs. Adicionalmente se incluyó el EGM *intl1*. Como marcador molecular de contaminación fecal humana se añadió el gen KP06_gp31 del fago crAssphage. El constructo (Fig. 2) fue insertado en el sitio de restricción *XbaI* del MCS (sitio multiclonal) del vector pUC57. La secuencia del inserto fue sintetizada e insertada por GenScript (GenScript, Piscataway, NJ, USA). Las secuencias de referencia de los GRAs fueron obtenidas de la base de datos CARD (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (<https://card.mcmaster.ca/>) (Alcock *et al.* 2020) y los cebadores fueron diseñados usando Primer-BLAST (NCBI) (Ye *et al.* 2012). Una curva de calibración fue generada usando una dilución serial de 10^6 a 10^1 copias del plásmido. La región hipervariable V4 del gen *16S rRNA* fue utilizado para la normalización de la cuantificación absoluta de los GRAs y el *intl1*. Los cebadores empleados en este estudio se muestran en la tabla 1.

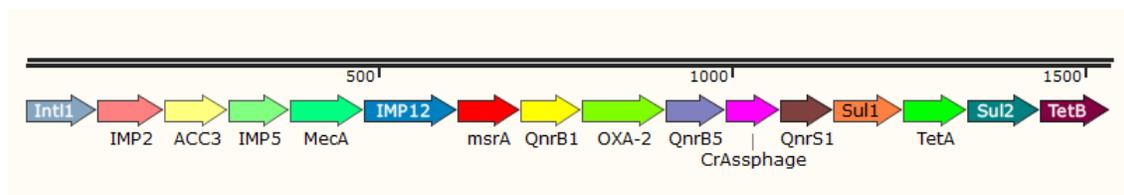


Figura 2. Constructo de blancos de PCR. Las secuencias blanco de 14 GRAs más el gen *intl1*, y el gen *KP06_gp31* del bacteriófago *crAssphage* fueron ensamblados juntos para ser insertados en el plásmido pUC57. El plásmido fue empleado como control positivo de los ensayos de qPCR y para diseñar la curva estándar para la cuantificación de los genes blanco.

Tabla 1. Cebadores empleados para la cuantificación de genes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).

| Gen | Forward (5' → 3') | Reverse (5' → 3') | Tamaño [bp] | Ref. |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|--|
| <i>sul1</i> | GGATTTTCTTGAGCCCCGC | CACCGAGACCAATAGCGGAA | 99 | Este estudio |
| <i>sul2</i> | TCATCTGCCAAACTCGTCGT | CAAAGAACGCCGCAATGTGA | 103 | Este estudio |
| <i>bla_{IMP-5}</i> | CTTGGTTTGTGGAACGCGG | TAAGCCACTCTATTCCGCC | 87 | Este estudio |
| <i>bla_{IMP-2}</i> | GAGCGCGTTTGCCTGATTTA | AGAAACAACACCCCAACCGT | 95 | Este estudio |
| <i>bla_{IMP-12}</i> | TGAAGAGGTTAGCGGTTGGG | CGCCCTACAAACCAAGCAAC | 132 | Este estudio |
| <i>bla_{OXA-2}</i> | GGTAGGATGGGTTGAGTGGC | ATAGAGCGAAGGATTGCCCG | 120 | Este estudio |
| <i>acc-3</i> | GTTGCTACGCCGATTGTTC | GCGATGTAGGCACCAAAACC | 92 | Este estudio |
| <i>tetA</i> | TCAATTTCTGACGGGCTG | GAAGCGAGCGGGTTGAGAG | 91 | Nolvak <i>et al.</i> (2012) |
| <i>tetB</i> | AGTGCGCTTTGGATGCTGTA | GCTGAGGTGGTATCGGCAAT | 98 | Este estudio |
| <i>msrA</i> | CTGCTAACACAAGTACGATTCCAA AT | TCAAGTAAAGTTGTCTTACCTACACC ATT | 89 | Zhu <i>et al.</i> (2013) |
| <i>mecA</i> | GGTTACGGACAAGGTGAAATACT GAT | TGTCTTTTAATAAGTGAGGTGCGTTA ATA | 106 | Zhu <i>et al.</i> (2013) |
| <i>QnrB-1</i> | GCGGCACTGAATTTATCGGC | GGCATCTTTCAGCATCGCAC | 86 | Este estudio |
| <i>QnrB-5</i> | CGGGGTGTTGATTTACAAGGC | GCCAATAATCGCGATGCCAA | 84 | Este estudio |
| <i>Intl1</i> | CAGCACCTTGCCGTAGAAGA | GAGGCATTTCTGTCTGGCT | 99 | Este estudio |
| <i>crAss-phage</i> | AGGAGAAAGTGAACGTGGAAACA | AACGAGCACCAATTTTAAGCTTTA | 78 | Modificado de García-Aljaro <i>et al.</i> (2017) |
| 16S rRNA | CCTACGGGAGGCAGCAG | TTACCGCGGCTGCTGGCAC | 192 | Zhang <i>et al.</i> (2017) |

Análisis microbiológicos

Estimación de Coliformes totales y *Escherichia coli*.

Se estimó la presencia de coliformes totales mediante fermentación en múltiples tubos y se estimó su densidad mediante la técnica de Numero Mas Probable (MPN), siguiendo el protocolo descrito por la APHA (APHA 2017), brevemente:

Para la detección de bacterias coliformes totales, se utilizó la técnica de fermentación en tubos múltiples, empleando tubos de caldo Lauril triptosa (SigmaAldrich) con tubos Durham invertidos dentro del medio. 100 mL de agua fueron empleados inicialmente. Las muestras de agua fueron homogenizadas por inversiones de las botellas (20 inversiones de cada una) antes de alicuotar las muestras. Luego de homogenizar la muestra de agua, 10 mL de estas fueron directamente sembrados en 10 mL de caldo Lauril triptosa (71.2 g/L), para una dilución final de 10:10. Posteriormente las muestras de agua fueron diluidas de manera seriada 5 veces (1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵), empleando 10 mL de inóculo en 90 mL de solución diluyente estéril (5 mL de MgCl₂ x 6H₂O + 1.26 mL KH₂PO₄ + 1L agua destilada). Se sembró 1 mL de inóculo en 10 mL de caldo Lauril Triptosa (35.6 g/L). Se utilizaron 3 tubos por cada dilución. Los tubos fueron incubados a 35 ± 0.5°C por 24 horas, tiempo después del cual fueron examinados para ver crecimiento bacteriano y formación de gas en los tubos Durham, cuando no se evidencio esto, los tubos fueron dejados en incubación 24 horas más, tiempo después del cual fueron reevaluados. Los tubos con evidente formación de gas fueron considerados positivos para coliformes totales.

Para la detección y estimación de *E. coli*, se utilizó la técnica de sustrato fluorogénico, empleando el medio EC-MUG (SigmaAldrich). Los tubos que mostraron señal positiva de fermentación en el caldo de Lauril triptosa fueron examinados. Empleando una aza metálica estéril de 3.5 mm de diámetro, se transfirió un inóculo del tubo con fermentación a un tubo con 10 mL de medio EC-MUG. Los tubos fueron colocados en baño maría a 44.5 ± 0.2°C por 24 horas y posteriormente examinados en búsqueda de crecimiento bacteriano y fluorescencia bajo luz UV. Los tubos que mostraron señal fluorescente azul brillante fueron considerados positivos.

Para la estimación de la densidad de coliformes totales y *E. coli* en las muestras, se empleó la técnica de Numero Mas Probable (NMP), según la tabla (Anexo 1).

Recuperación y aislamiento de microorganismos

Un volumen de 300 mL de agua fue filtrado a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 45 μm de diámetro (Thermo Fisher), con ayuda de una bomba. Un octavo de cada filtro fue cortado y la biomasa atrapada en el filtro se cultivó en caldo LB a 37°C por 18 hrs a 180 rpm. Después de la incubación, 100 μL de caldo fueron inoculados sobre placas de agar MacConkey y CHROMAgar (CHROMagar™), en duplicado, las placas fueron incubadas a 37°C por 18 hrs. Después de la incubación, aproximadamente 10 colonias (5 lac+ y 5 Lac-) fueron aisladas de cada placa Mac Conkey y CHROMAgar, las cepas aisladas fueron cultivadas en caldo LB y almacenadas a -80°C con 15% glicerol para su posterior análisis. El medio CHROMAgar permite la distinción de bacterias *E. coli* mostrándolas de un color rosado oscuro a rojizo.

Caracterización fenotípica y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las cepas aisladas fueron cultivadas en *Chromogenic Coliform Agar* (ThermoFisher), para distinguir las colonias de bacterias coliformes y *E. coli*. Las colonias de bacterias coliformes aparecen de color rosado a rojo en el agar, mientras que las colonias de *E. coli* presentan una coloración azul oscuro a violeta.

Las colonias identificadas como *E. coli* fueron analizadas empleando el sistema PhenePlate™ (PhPlate Microplate Techniques AB, Saltsjö-Boo, Sweden). Brevemente, las colonias de *E. coli* identificadas en el *Chromogenic Coliform Agar* fueron seleccionadas para la evaluación de su perfil bioquímico mediante el monitoreo del crecimiento bacteriano en 11 diferentes sustratos de carbono: a. celobiosa; b. sucrosa; c. gentobiosa; d. rafinosa; e. adonitol; f. sorbosa; g. L-fucosa; h. arbutina; i. citrato; j. malonato; y k. ornitina (Kuhn 1993). Las PhPlates son placas de 96 pocillos que contienen los 11 diferentes sustratos distribuidos en cada una de las columnas (2-11) de la placa, la primera columna no contiene ningún sustrato y sirve para preparar el inóculo y dispensarlo al resto de la placa. En los pozos de las columnas 2-12 se dispensaron 150 μL de medio de suspensión (0.1% proteasa-peptona + 0.01% bromothymol blue + 0.3M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄), mientras que en el primer pozo de cada fila se dispuso 200 μL de medio de suspensión y con ayuda de un aza estéril se inoculó una sola colonia, una vez homogenizado el contenido del primer pozo de cada fila fue dispensado en el resto de los pozos de la fila, 10 μL por pozo. Las

placas fueron incubadas a 37°C toda la noche, y al día siguiente fueron fotografiadas y las fotografías fueron utilizadas para obtener datos de absorbancia de cada uno de los pozos empleando el software PhenePlate™ (PhPlate Microplate Techniques AB).

En paralelo, se evaluó el perfil de resistencia de las 34 colonias de *E. coli* aisladas, para esto se empleó el sistema AREB (PhPlate Microplate Techniques AB, Saltsjö-Boo, Sweden). El sistema AREB consiste en el uso de placas de 96 pocillos con 10 antibióticos deshidratados predispensados en las columnas 2-11 (a. ampicilina; b. cefoaxima; c. ceftazidima; d. cloranfenicol; e. ciprofloxacina; f. gentamicina; g. ácido nalidíxico ; h. cefpodixima; i. tetraciclina y j. trimetoprima), la columna 12 como control positivo de crecimiento bacteriano y la primera columna de la placa es utilizada para la preparación del inóculo, en esta primera columna se dispensan 20 µL del inóculo preparado en la primera columna de las PhenePlates, una vez homogenizado se distribuye 10 µL a cada uno de los pozos restantes de cada fila, donde previamente se dispense 200 µL de medio (Caldo Mueller-Hinton + 1% de TPTC/100 mL). Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche, posteriormente las placas fueron fotografiadas y las imágenes fueron analizadas empleando el software *Microplate Analyser* (www.phplate.se). (Colque Navarro *et al.* 2014). Tanto los ensayos de PhenePlates como los ensayos AREB incluyeron como controles de calidad las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Pruebas de difusión de disco Kirby-Bauer

Un total de 69 cepas fueron seleccionadas al azar para determinar su patrón de resistencia fenotípica a 13 antibióticos diferentes mediante ensayo de difusión de discos. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo de la EUCAST (Matuschek *et al.* 2014) con algunas modificaciones. Brevemente, se emplearon placas Petri de vidrio (100 mm) con medio Mueller-Hinton (Sigma) no suplementado estéril (0.4 mm de espesor). El inóculo fue preparado en 3 mL de medio LB incubado durante toda la noche a 37°C y 150 rpm. El cultivo fue diluido con medio LB fresco hasta una absorbancia de 0.8-1.2 a 660 nm. Las placas fueron inoculadas usando un hispo estéril sumergido en la suspensión bacteriana, las bacterias fueron inoculadas uniformemente en toda la superficie del medio en la placa, hasta cuatro discos de difusión fueron colocados por placa dentro los 15 minutos siguientes a la inoculación. Las placas fueron incubadas invertidas por 18 ± 2 horas a 35°C. Los halos

de inhibición de crecimiento bacteriano fueron medidos con ayuda de un vernier inmediatamente luego de la incubación. Todos los ensayos incluyeron un análisis de control de calidad empleando las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213. Los datos de diámetro de los halos fueron interpretados según la tabla de *breakpoints* de EUCAST versión 8.1 para enterobacterias, excepto para los antibióticos no contemplados en EUCAST, donde se empleó la guía del CLSI (CLSI 2015).

Los antibióticos usados en el análisis fueron: ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (10 µg), estreptomycin (10 µg), amikacina (30 µg), gentamicina (10 µg), piperacilina-tazobactam (30-6 µg), ampicilina (10 µg), ertapenem (10 µg), doripenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg). Cepas que presentaron 3 o más resistencia a antibióticos fueron consideradas multirresistentes.

Secuenciación metagenómica

La secuenciación metagenómica fue realizada en el *Center for Translational Microbiome Research* (CTMR) del *Departamento of Tumor and Cell Biology* del Karolinska Institutet en Estocolmo Suecia. Las librerías para la secuenciación metagenómica de las muestras fueron preparadas empleando el kit *MGI FS DNA Library Prep kit* (96x, 1000006988; MGI, Shenzhen - China). La preparación de las librerías se realizó de acuerdo a instrucciones del fabricante, salvo que se emplearon 50 ng de ADN en lugar de 200 ng (para algunas muestras con muy bajo contenido de ADN 20 ng de ADN fueron considerados aceptables). Debido a la baja concentración de ADN con la que se trabajó, en lugar de una doble limpieza de las *beads* para seleccionar por tamaño, se realizó una sola limpieza. El kit usa fragmentación enzimática de ADN seguido de un *barcoding* de las muestras (usando 7 ciclos de PCR), circularización de la hebra de ADN de simple cadena y la construcción de una nano-esfera de ADN. Todo el procedimiento se realizó de manera automática usando los robots SP-960 y SP-100 (MGI). La secuenciación se realizó en un secuenciador DNBSEQ-G400 (MGI) empleando un set de secuenciación de alto rendimiento (PE150 10000016952; MGI) con las librerías de ADN cargadas manualmente en la celda de flujo.

Para la anotación de las muestras, el pipeline STAG-mwc fue utilizado (StaG-mwc v0.4.0), información detallada puede encontrarse en: <https://stag->

mwc.readthedocs.io/en/latest/index.html. Brevemente, las lecturas humanas fueron removidas usando ‘*Kraken2*’ (versión v2.0.8-beta) contra el referente humano GRCh38 incorporado. Para la designación taxonómica del resto de las lecturas, ‘*Kraken2*’ (versión v2.0.8-beta) fue empleado contra una base de datos generales (construida con una biblioteca de secuencias de arquea, bacteria, virus y hongos), con intervalo de confianza de 0.5. El conteo de grupos taxonómicos obtenido de *Kraken* fue analizado en R empleado los paquetes ‘*phyloseq*’ y ‘*metacoder*’ (versión 0.3.4)

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software R 3.6.1. (R Core Team 2017). Un análisis de varianza (ANOVA) fue empleado para analizar la significancia de las diferencias de los parámetros fisicoquímicos entre los sitios analizados. La distribución de residuos y la homogeneidad de varianza fueron analizados empleando el *quantile-quantile plot* (q-qPlot) y diagramas de dispersión, respectivamente. Cuando los datos no se ajustaron a los supuestos de la distribución de residuos y homogeneidad de varianza, la función ‘*Box-cox*’ fue empleada para escoger la transformación adecuada. Cuando las pruebas de ANOVA resultaron significativas, la comparación por pares entre medias a través del análisis *post-hoc* Tukey fue empleado. El paquete ‘*multcomp*’ (Versión 1.4–10) fue empleado para realizar comparaciones múltiples. Correlaciones de Pearson fueron realizadas para evaluar las correlaciones entre parámetros fisicoquímicos, así también entre los genes cuantificados, los parámetros analizados mediante correlaciones de Pearson fueron normalizados empleando logaritmo en base 10.

Un mapa de calor con ordenamiento jerárquico (*hierarchical clustering ordination*) fue utilizado para presentar la abundancia normalizada de los genes cuantificados empleando el paquete ‘*gplots*’ (Versión 3.0.1.1).

El análisis de componentes principales (PCA) fue empleado tanto para explorar los sitios de muestreo en función de sus variables ambientales y para examinar las relaciones entre los genes cuantificados, las descargas fecales, las variables fisicoquímicas y los metales cuantificados. Los puntos de muestreo fueron ordenados en función de su abundancia normalizada de GRAs y del *intl1*. Los ejes que explican mejor la variación fueron extraídos (Componente 1 y 2) y un modelo lineal (Lm) pamétrico fue empleado para

explorar la relación entre la ordenación de los puntos de muestreo a lo largo de los ejes del PCA con las variables ambientales. La selección del mejor modelo de regresión fue realizada automáticamente empleando la función ‘*regsubsets*’ (*backward* y *forward*) del paquete ‘*leaps*’ (Versión 3.1) en función del valor de R^2 ajustado. El paquete ‘*car*’ (Versión 3.0–3) fue empleado para calcular el VIF (*variance inflation factor*) de las variables independientes para evitar multicolinealidad. Los paquetes ‘*factoextra*’ (Versión 1.0.6), y ‘*vegan*’ (Versión 2.5–5) fueron empleados para el análisis de ordenación. Los datos de abundancia de GRAs, *intl1* y las variables independientes (CE, pH, niveles de metales y la abundancia del marcador de contaminación fecal crAssphage) fueron logarítmicamente transformados antes del análisis.

Diferentes índices de diversidad alfa fueron calculados para cada punto y sitio de muestreo en R empleando el paquete ‘*phyloseq*’. La variación en la diversidad de las comunidades microbianas (diversidad beta) fue analizada mediante disimilitud de Bray-Curtis empleando el paquete ‘*vegan*’.

Como parte de la exploración de las relaciones entre los parámetros ambientales (pH, CE, niveles de metales y abundancia del marcador de contaminación fecal crAssphage) con la abundancia de los genes cuantificados y la composición de la comunidad microbiana, se realizaron pruebas de Mantel entre las diferentes matrices de datos (Sitios x Variables ambientales; Sitios x Abundancia relativa de los genes cuantificados; Sitios x Abundancia relativa de los taxones). La prueba de Mantel fue realizada empleando el paquete ‘*vegan*’ (Versión 2.5–5).

RESULTADOS

Condiciones fisicoquímicas y niveles de metales pesados

Se evaluaron las características fisicoquímicas y la concentración de metales en cada sitio de estudio. Se colectaron datos de pH y CE del agua *in situ* y antes de la recolección de sedimentos en el sitio de muestreo. Como se muestra en la figura 2a, los puntos de muestro dentro de la laguna de Milluni Chico (MC) presentaron los niveles más bajos de pH (2.32 ± 0.06). MC está directamente afectado por los drenajes ácidos de mina (DAM) y presenta una intensa coloración naranja. Los puntos de muestreo en la laguna de Pata Khota

(PK) presentaron un pH casi neutro (Fig. 3a). Los valores más bajos de CE fueron registrados en PK, mientras que MC y Uru Uru (UP1, UP2 y UP3) presentaron valores significativamente más altos, con la excepción de UP1 (Fig. 3b).

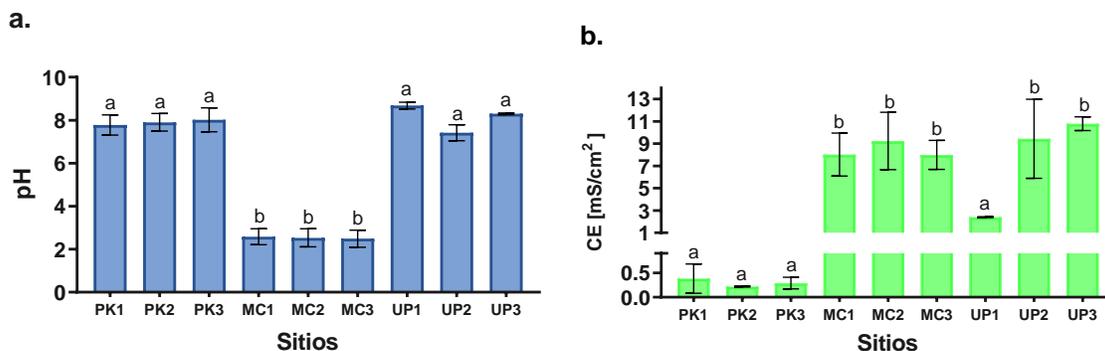


Figura 3. Parámetros fisicoquímicos. Los valores de las medias se muestran en barras, mientras que la desviación estándar se muestra como barras de errores. Las letras cuando diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) calculados por ANOVA. **a.** pH y **b.** conductividad eléctrica (CE) del agua en los sitios de muestreo.

Se cuantificaron 6 elementos (As, Cd, Pb, Ni, Cu y Zn) en los sedimentos colectados. Los resultados (Fig. 4) muestran diferencias claras en la composición de metales de los sitios de muestreo. UP3 en el lago Uru Uru, es el punto con mayor concentración de Zn (1811 mg Kg^{-1} de sedimento). En comparación con los demás sitios de muestreo, niveles más altos de As, Cd, Pb, Ni y Cu fueron hallados en UP3, con diferencias estadísticamente significativas salvo comparando con los niveles de Cu en MC. Después de UP3, los sitios en MC presentaron los niveles más altos de todos los elementos analizados, con concentraciones significativamente más altas que en UP2, niveles significativamente más altos de As, Cd, Ni, y Zn en relación a los sitios de PK, y también significativamente más altos que en UP1, con excepción del As, Cu y Cd. UP1 presentó niveles más altos de As, Pb, Ni y Cu en comparación con UP2. En general, las muestras colectadas en PK y UP2 presentaron los niveles más bajos de todos los metales analizados, excepto por Cu que presentó concentraciones estadísticamente significativas más altos en UP2 ($p < 0.05$).

Todos los puntos directamente impactados por actividades mineras (UP3 seguido de MC y UP1) presentaron los niveles más altos de As, Cd, Cu y Zn.

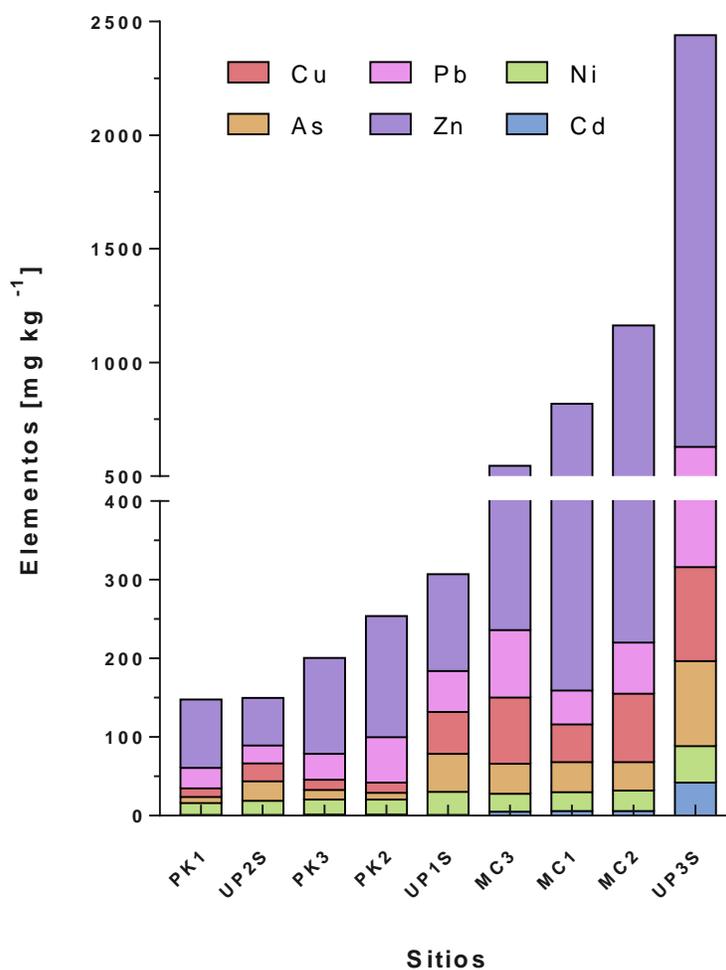


Figura 4. Niveles de metales en los sedimentos. Los niveles de metales totales (mg Kg^{-1}) medidos en muestras de sedimentos se muestran en barras con valores acumulados para cada punto de muestreo.

Se realizó un PCA para visualizar la distribución de los sitios de muestreo en función de las variables ambientales (Fig. 5). Todos los puntos de PK presentaron valores muy similares, y fueron agrupados juntos por el análisis así también los puntos de MC. En contraste, los puntos en el lago Uru Uru fueron claramente diferenciados entre ellos por sus características fisicoquímicas y sus niveles de metales.

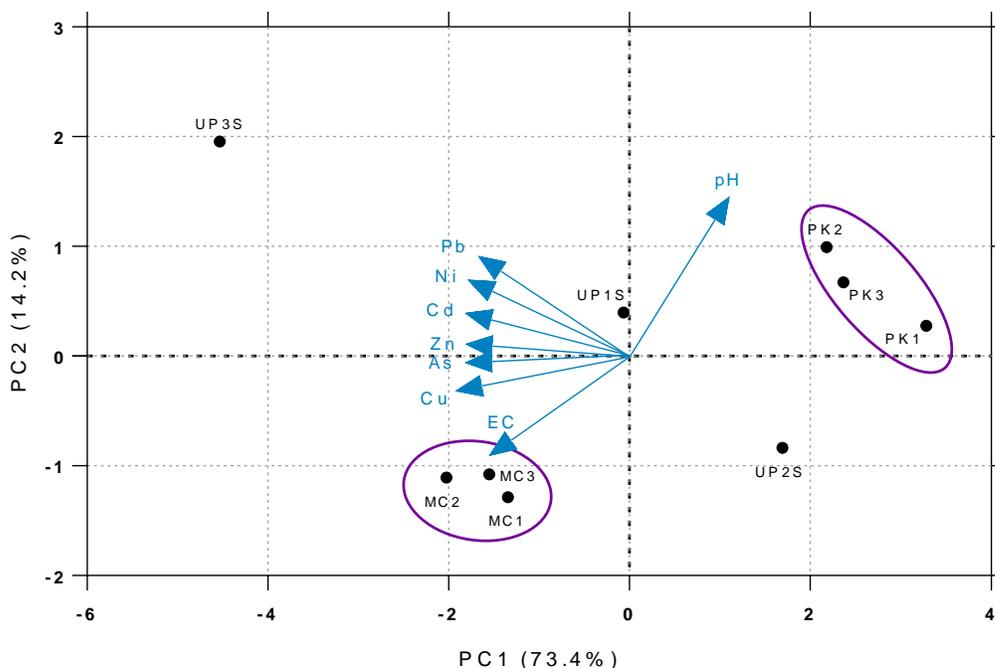


Figura 5. Análisis de Componentes Principales (PCA) de los parámetros ambientales de los sitios de muestreo. Un análisis de ordenación por PCA fue empleado para observar la distribución de los sitios de muestreo basados en sus características fisicoquímicas y en los niveles de metales cuantificados. Todos los sitios de la laguna PK muestran características similares entre si (bajos niveles de metales, pH neutro y baja CC), del mismo modo los sitios en MC se agrupan en función de sus parámetros, lo que no sucede con los sitios del lago Uru Uru, siendo cada uno de estos claramente distinto de los otros.

Por otro lado, las correlaciones de Pearson entre las variables ambientales fueron analizadas para observar los patrones de dichas variables (Fig. 6), los resultados mostraron que todos los niveles de metales pesados están positivamente correlacionados entre ellos sin embargo existe una correlación negativa entre el pH y la CE.

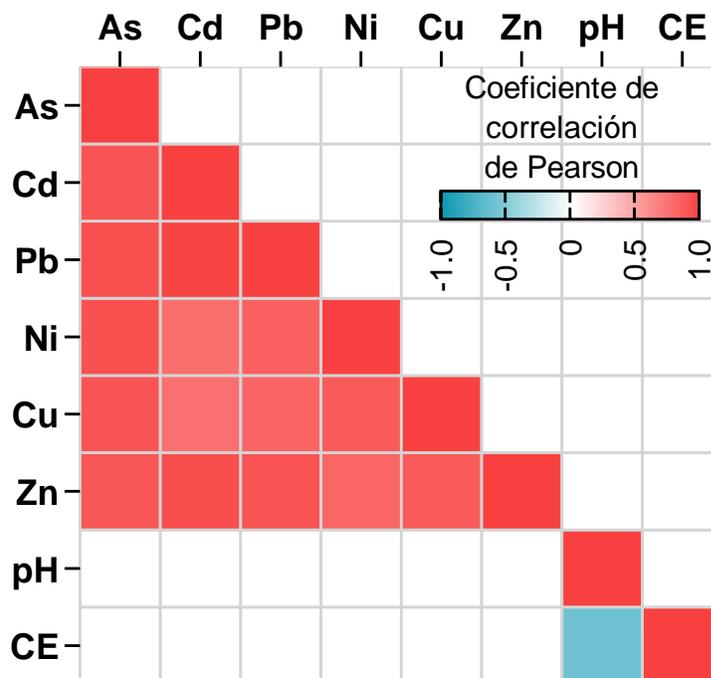


Figura 6. Matriz de correlaciones entre metales y parámetros fisicoquímicos. El coeficiente de correlación de Pearson (R) se presenta en escala de colores. Solo las correlaciones significativas ($p < 0.05$) son presentadas en la matriz. Todos los metales presentan correlaciones positivas entre ellos.

Detección y cuantificación de GRAs y EGMs

Para determinar la presencia y cuantificar la abundancia de GRAs, se extrajo el ADN total de las comunidades microbianas presentes en las muestras de agua y sedimentos colectadas en los sitios de muestreo. Basado en los resultados obtenidos al emplear los *Microbial ADN Array for Antibiotic Resistance* (Qiagen, Hilden, Germany) en el análisis de las muestras de PK y MC en un estudio anterior (Agramont 2018), se diseñó un plásmido con un inserto que contiene las secuencias de 14 GRAs diferentes (ver Métodos). Las secuencias de ADN incluidas en el plásmido corresponden a genes que confieren resistencia a tetraciclina (*tetA*, *tetB*), antibióticos β -lactámicos (*bla_{OXA-2}*, *bla_{IMP-2}*, *bla_{IMP-5}*, *bla_{IMP-12}*, *acc-3*), meticilina (*mecA*), quinolonas (*qnrB1*, *qnrB5*, *qnrS1*), macrólidos-licosamina-estreptogramina B (*msrA*) sulfametoxazol (*sul1* y *sul2*). Estos últimos genes no

fueron incluidos en el array de screening, pero fueron previamente reportados en Milluni (Archundia *et al.* 2017). Además, un fragmento de la secuencia del gen KP06_gp31 del bacteriófago crAssphage y un fragmento del gen *intl1* fueron incluidos en el constructo. El plásmido fue utilizado para generar todas las curvas estándar de los ensayos de qPCR.

La abundancia normalizada de los genes encontrados se muestra en la figura 7. El gen *acc-3* fue detectado únicamente en las muestras del canal Tagarete (UP2), tanto en sedimentos como en aguas. El integron de clase 1, junto con *bla_{OXA-2}* y *sul1*, fueron detectados en todas las muestras. El marcador de contaminación fecal crAssphage fue detectado en las muestras de agua y sedimentos de Uru Uru y sus tributarios, en el caso de UP1 crAssphage fue detectado solo en el agua y no en los sedimentos. UP2, el sitio que recibe directamente descargas de aguas servidas presentó los niveles más altos del marcador de contaminación fecal. En contraste, crAssphage no fue detectado en las muestras de PK y MC. En general UP2 y UP3 fueron los puntos que presentaron mayor abundancia de todos los genes cuantificados, siendo *intl1*, *sul1*, *sul2*, y *bla_{OXA-2}* los más abundantes. Salvo por PK3, el clúster jerárquico reveló un patrón diferente de abundancia de genes entre Milluni y Uru Uru.

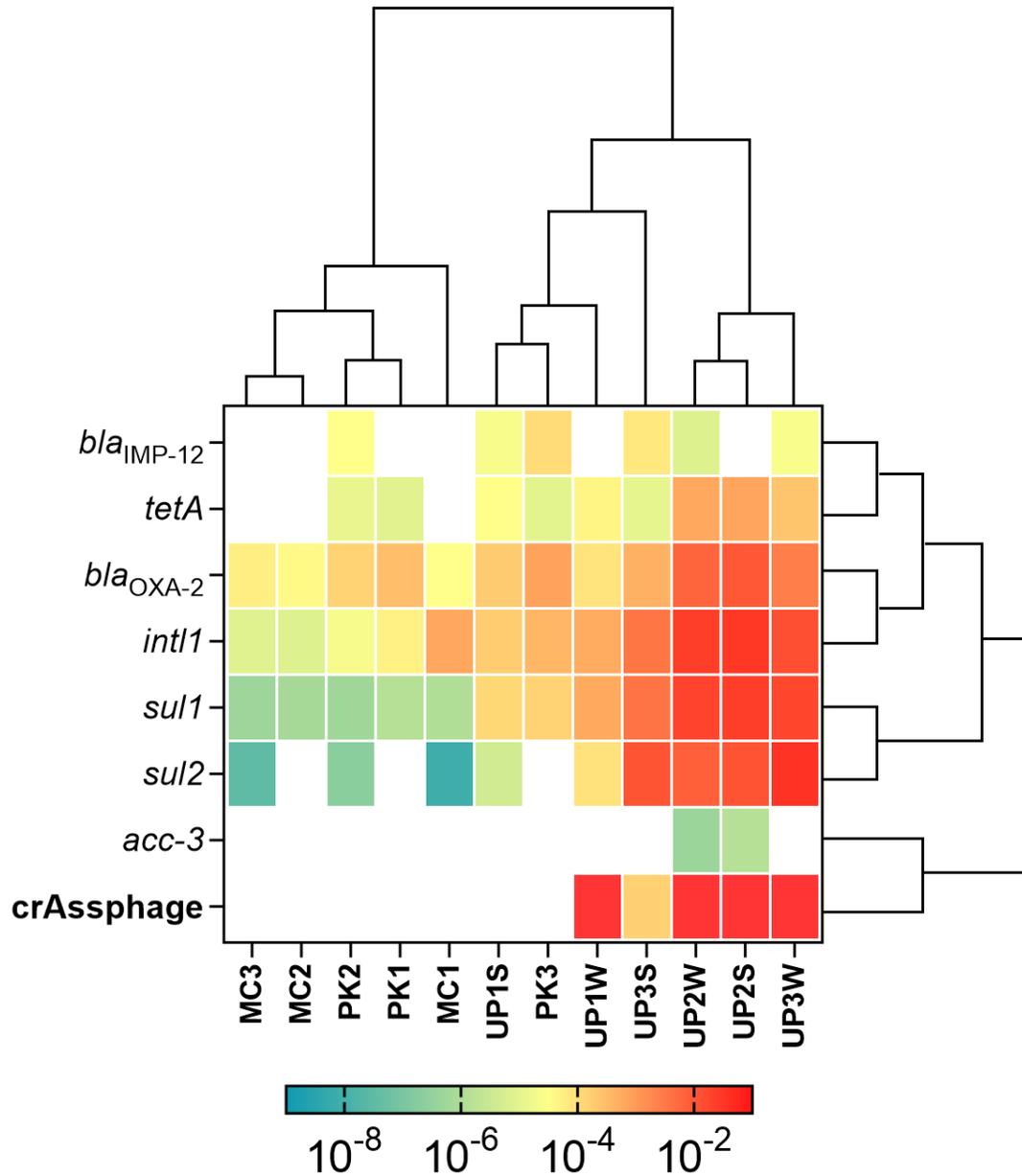


Figura 7. Abundancia normalizada de GRA, intl1 y CrAssphage detectados en sedimentos y aguas. Los valores de abundancia de GRAs e *intl1* fueron normalizados en función a la abundancia del gen 16S rRNA. Los valores de abundancia absoluta de CrAssphage fueron incluidos. Los datos fueron transformados empleando $\text{Log}_{(10)}$ y representados en un mapa de calor donde, los colores más rojizos representan una mayor abundancia. Las filas y columnas fueron ordenadas en función a su similitud mediante *hierarchical clustering*. S: sedimento; W: Agua. Los puntos con mayor abundancia de genes corresponden al Lago Uru Uru, en especial UP2 y UP3.

Dado de muchos GRAs y EGMs se encuentran físicamente ligados, el patrón de coocurrencia de los genes incluidos en el estudio fue evaluado mediante correlación de Pearson de la abundancia normalizada de todos los genes detectados (Fig. 8). El gen *intl1* presentó correlación positiva con los genes *sul1*, *sul2*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA*. Mas aún, estos últimos genes también mostraron correlaciones positivas entre ellos, con la excepción de *sul2* y *tetA*. La abundancia de *tetA* presento una correlación inversa con la abundancia de *bla_{IMP-12}*. Los valores de abundancia absoluta de crAssphage presentaron una fuerte correlación con *intl1*, *sul1*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA*, pero las correlaciones no fueron significativas.

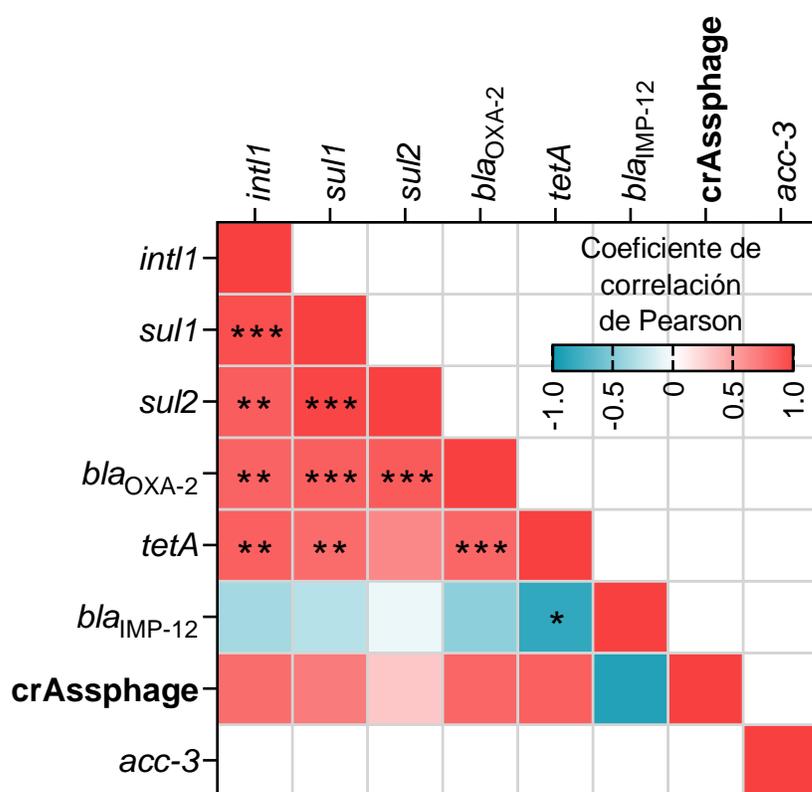


Figura 8. Correlaciones entre los genes cuantificados. El coeficiente de correlación de Pearson (R) se representó en un *mapa de calor* de colores. La significancia de la correlación se representa con asteriscos: $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$.

Evaluación de la Composición de las comunidades microbianas en agua y sedimentos.

La composición de las comunidades microbianas en las muestras de agua y sedimentos fue analizada mediante secuenciación metagenómica *shotgun*. No se recuperó información de la secuenciación del punto de muestreo MC1. Para evaluar la diversidad de las comunidades microbianas, las diferencias entre las comunidades microbianas de cada muestra (diversidad beta) fue analizada mediante una matriz de disimilitud de Bray-Curtis, y ordenación por clúster jerárquico (Fig. 9a). Las comunidades microbianas se agruparon según su sitio de procedencia, formando 4 clústeres: uno conformado por las muestras de PK, otro por las muestras de MC, el tercero por las muestras UP1S, UP3S y UP3W y el ultimo clúster agrupo las muestras UP2S y UP2W, mientras que UPW1 fue excluido de todos estos clústeres, guardando menor disimilitud con UP2S y UP2W. El índice de Shannon fue calculado para cada muestra (Fig. 9b), las muestras de MC y UP1W presentaron los valores más bajos del índice de diversidad de Shannon, las muestras de agua y sedimentos de los puntos de Uru Uru fueron agrupados, al igual que las muestras de las lagunas PK y MC para evaluar mediante ANOVA la diferencia en diversidad entre estos sitios. MC presento diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con los puntos UP1, UP2 y UP3, que presentaron valores más altos del índice de Shannon (Fig. 9c).

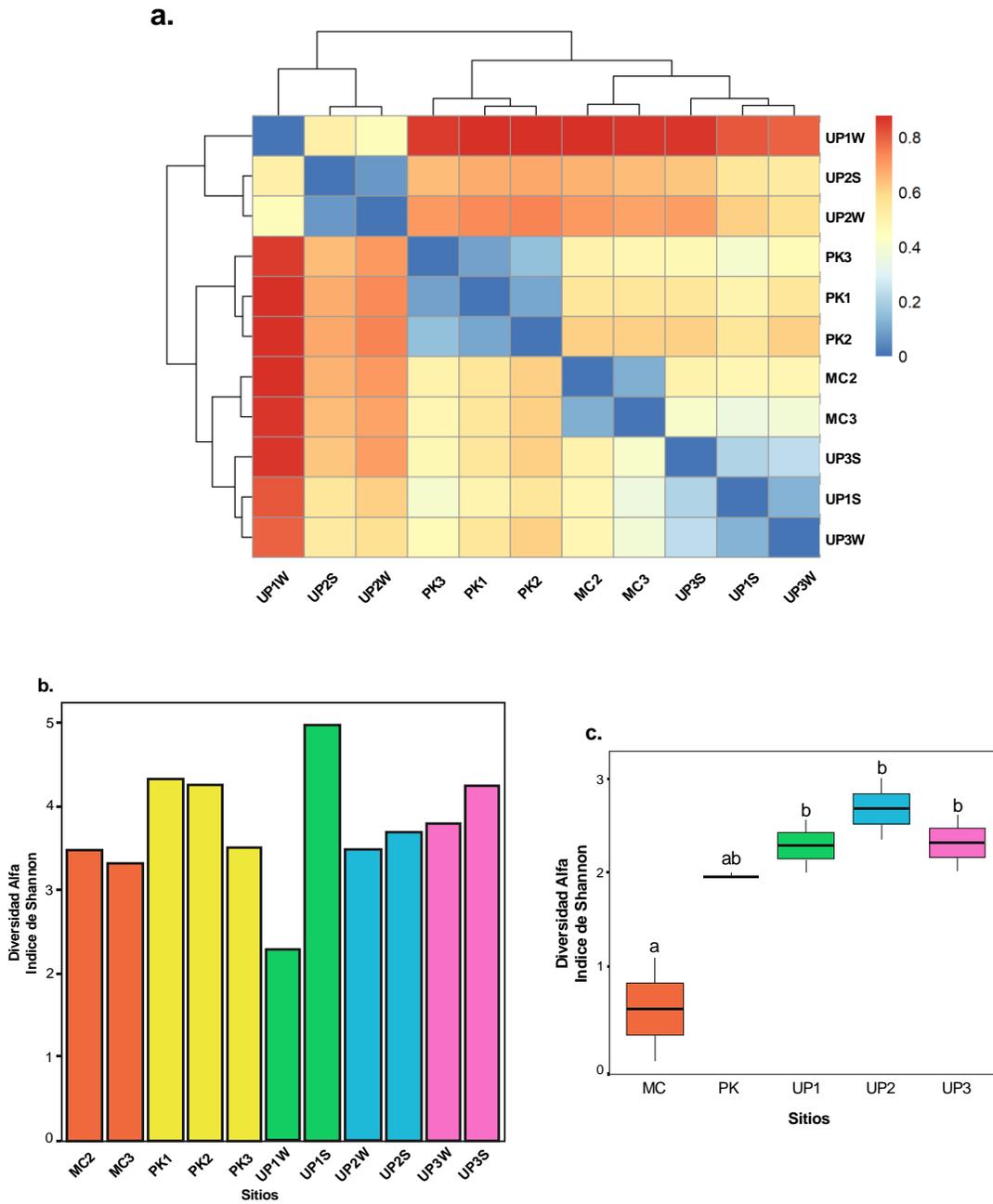


Figura 9. Diversidad de las comunidades microbianas. **a.** comparación de la diversidad microbiana entre sitios de muestreo mediante una matriz de disimilitud de Bray-Curtis, y ordenamiento por clúster jerárquico. El color rojo indica mayor disimilitud entre muestras, mientras que el color azul señala mayor similitud entre estas.; **b.** Índice de Shannon de cada uno de los sitios analizados; **c.** comparación mediante ANOVA del índice de diversidad de Shannon entre las lagunas de MC, PK y los sitios UP1, UP2 y UP3.

La abundancia relativa de grupos filogenéticos de bacterias fue recobrada, con asignaciones taxonómicas a nivel de familia, género y especie (Fig. 10 y anexos 2 y 3). Los géneros dominantes en las muestras de PK fueron: *Bradyrhizobium* (45.6%), y *Methanosarcina* (8.85%), mientras que en las muestras de MC los géneros dominantes fueron: *Thiomonas* (34.94%), *Acidiphilium* (6.86%) y *Pseudomonas* (5%). El punto UP3S presento como genero dominante a *Thaurea* (7.63%), mientras que UP3W y UP1S estuvieron dominados por: *Porphyrobacter* (8.89%) y *Pseudomonas* (5.49%). Las muestras UP1W, UP2S y UP2W estuvieron dominados por *Limnohabitans* (40.11%), además estos dos últimos puntos también presentaron los géneros *Gemmobacter* (9.66%), *Hydrogenophaga* (8.52%), *Flavobacterium* (8.4%) y *Acidovorax* (6.35%). UPW1 presento como segundo genero dominante a *Polynucleobacter* (18.15%).

El taxon a nivel de especie con mayor abundancia relativa en las muestras de PK fue *Bradyrhizobium erythropieii* (18.21%), mientras que UP2S, UP1W, UP2W se caracterizaron por mostrar alta abundancia relativa de *Limnohabitans* sp. (32.92%). PK3 y UP1S presentaron una elevada abundancia de *Methanosarcina lacustris* (12.53 y 11.86% respectivamente), otros taxones que destacaron en UP2S y UP2W fueron *Gemmobacter* sp. (11.49 y 12.61% respectivamente) e *Hydrogenophaga* sp. (8.04 y 8.11% respectivamente). Los sedimentos de MC2 y MC3 se caracterizaron por presentar tres taxones principales: *Burkholderiales bacterium* GJ-E10 (32.98 y 21.96% respectivamente), *Thiomonas* sp. x19 (29.66 y 24.72% respectivamente) y *Leptospirillum ferrooxidans* (2.43 y 1.17% respectivamente).

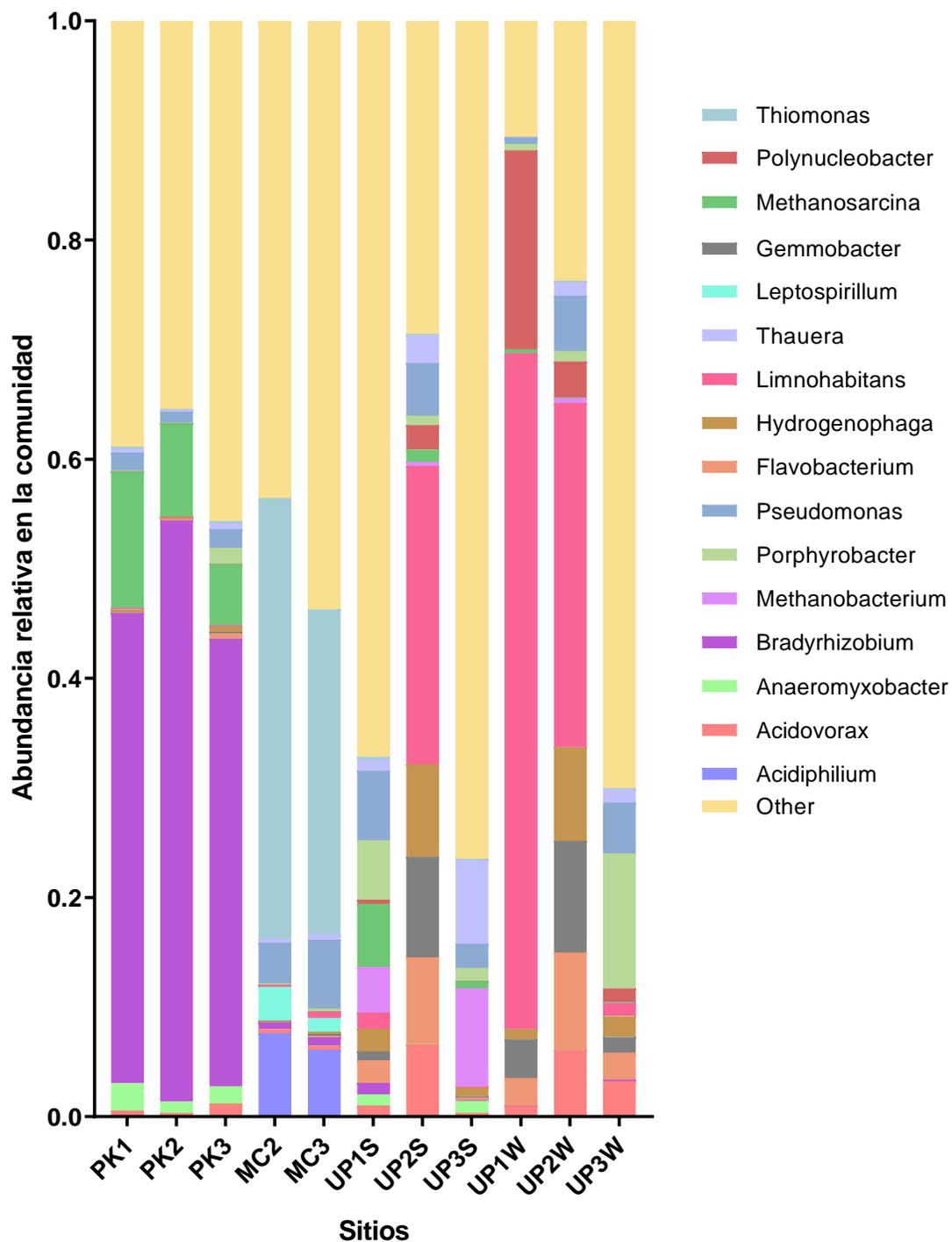
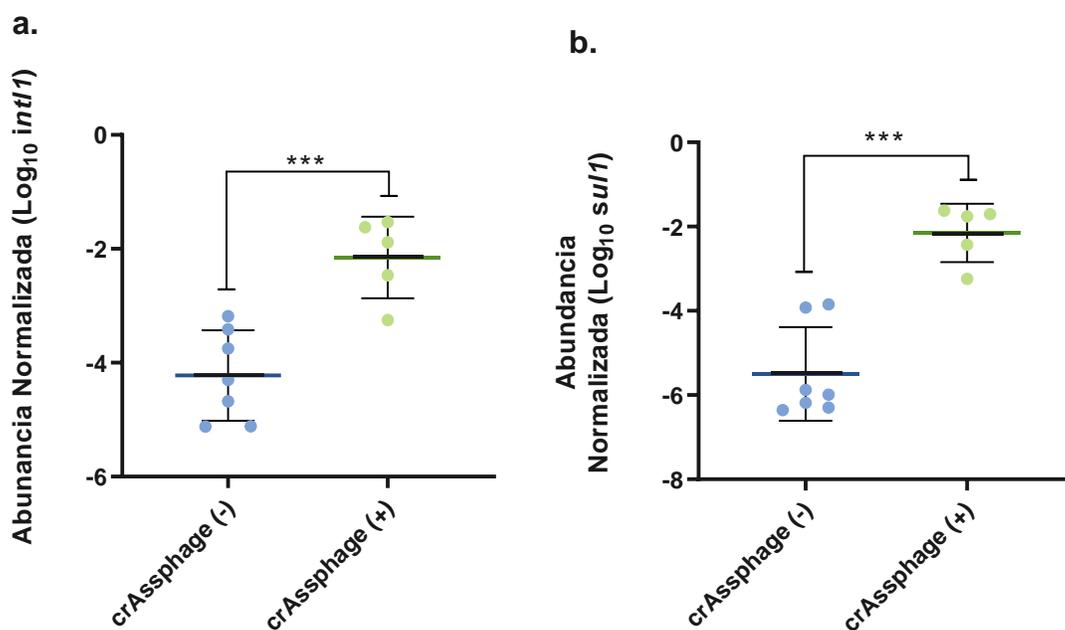


Figura 10. Composición de las comunidades microbianas a nivel de género.
 Abundancia relativa de bacterias presentes en la comunidad microbiana asignadas taxonómicamente a nivel de género. S: sedimentos; W: Agua.

Contaminación fecal y GRAs

Para evaluar si la contaminación fecal contribuye a la abundancia de *int11* y los GRAs, un ANOVA de una vía fue realizado, para comparar la abundancia de *int11* entre muestras con y sin la presencia del marcador de contaminación fecal crAssphage. Las muestras en las cuales crAssphage fue detectado presentaron una abundancia de *int11* significativamente mayor ($p < 0.001$) comparadas con las muestras en las cuales el marcador de contaminación fecal no fue detectado. Mas aun, la abundancia de los GRAs que presentaron correlaciones positivas con *int11* (i.e., *sul1*, *sul2*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA*) también presentaron una diferencia estadísticamente significativa en muestras sin y con crAssphage, presentando mayor abundancia en las muestras en las que se detectó el marcador de contaminación fecal (Fig. 11).



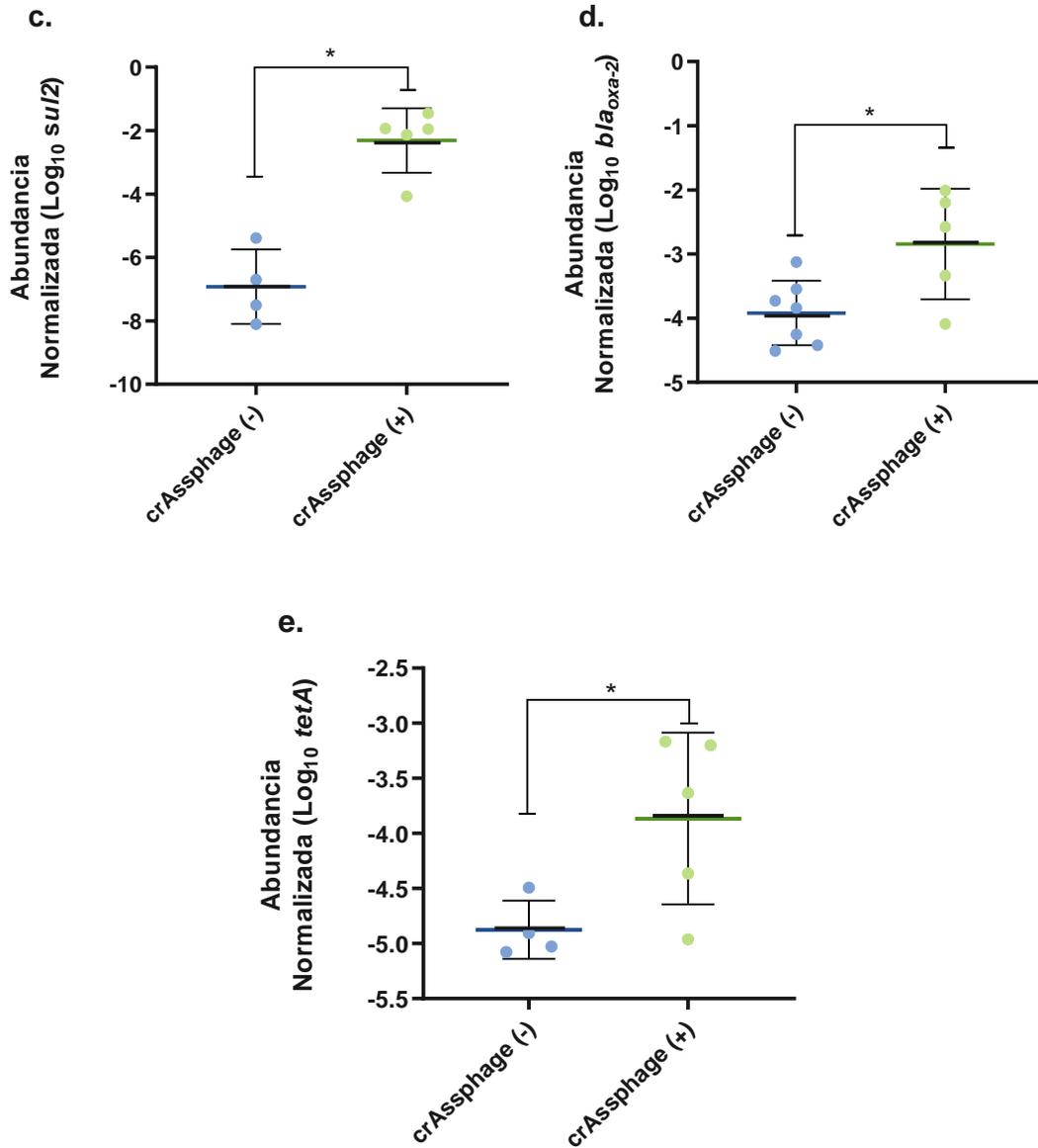


Figura 11. Abundancia de GRAs e *intl1* en función a la presencia de crAssphage. La abundancia de *intl1*, *sul1*, *sul2*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA* entre muestras con y sin la presencia de crAssphage fueron comparadas por medio de ANOVA. La abundancia de los genes analizados fue significativamente mayor en los puntos que presentaban el marcador de contaminación fecal crAssphage.

Relación entre GRAs, variables ambientales y composición de la comunidad microbiana

La relación entre la abundancia de GRAs, *intl1*, crAssphage, y los factores ambientales (niveles de metales, pH y CE), fue evaluada mediante prueba de Mantel y un análisis de componentes principales. La prueba de Mantel mostró que existe correlación positiva entre la composición de la comunidad microbiana y la abundancia de GRAs e *intl1* ($R= 0.467$, $p < 0.01$), del mismo modo la composición de la comunidad microbiana está correlacionada a la abundancia de crAssphage ($R = 0.6441$ $p < 0.01$), y débilmente a la CE de los sitios de muestreo ($R= 0.3449$ $p < 0.05$). Mediante un análisis de Componentes principales la abundancia de los GRAs, *intl1* fueron reducidos a los primeros dos componentes principales (PCs) que explicaron el 69.5 y 16.3% de variación respectivamente. Un modelo lineal múltiple se empleó para ver si a lo largo de los PCs, la ordenación de las muestras en función a sus abundancias de genes, responde o no una variable ambiental (Fig. 12). La regresión lineal mostró que el PC1 (eje x) presento relación lineal positiva con la abundancia de crAssphage, pH y la CE (Adj. $R^2 = 0.969$; $F= 50.52$; $p < 0.05$), sugiriendo que la contaminación fecal, valores neutrales de pH y CE elevadas son las tres condiciones relacionadas con una mayor abundancia de GRAs e *intl1*. La prueba de Mantel corroboró estos resultados mostrando que la abundancia de genes se ve influenciada por las variables ambientales en conjunto ($r = 0.4154$, $p < 0.05$), muy débilmente por los metales ($r= 0.2594$, $p < 0.05$), el pH ($r= 0.3774$, $p < 0.05$), siendo la abundancia del fago crAssphage el factor más importante ($r = 0.5083$, $p < 0.001$), Ninguna relación estadísticamente significativa se encontró para el PC2 (eje y).

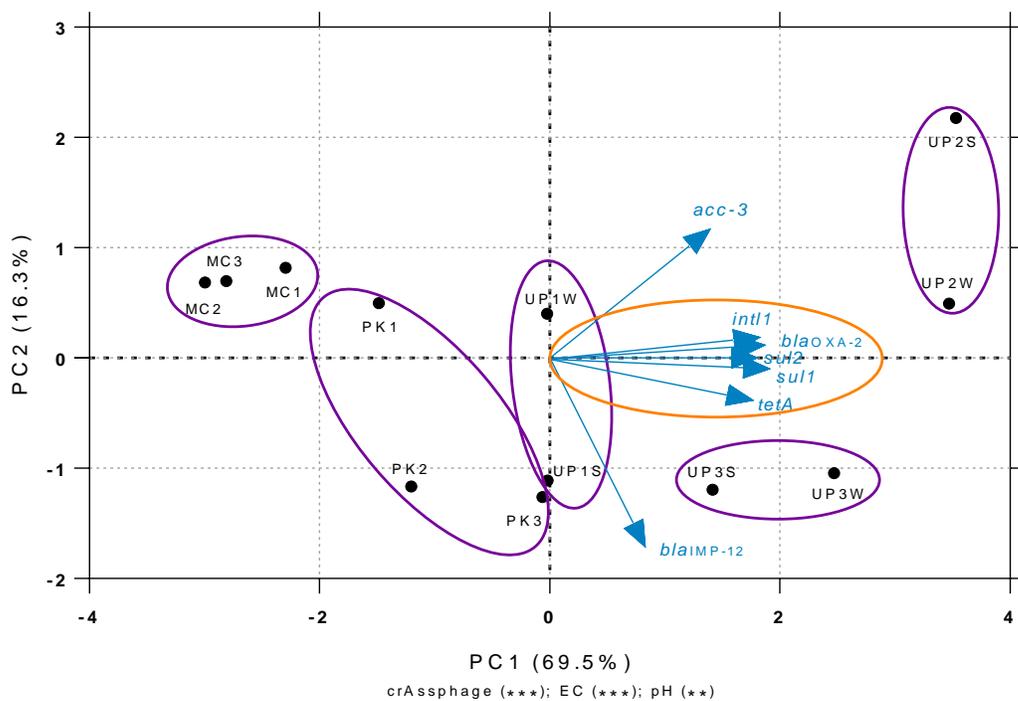


Figura 12. Relación entre variables ambientales y la abundancia de int11 y GRAs.

El PCA fue realizado con los datos de abundancia normalizada de GRAs e int11 de cada sitio. Se realizó una regresión lineal múltiple (Lm) de los componentes principales (PCs) con los niveles de metales, pH, CE y la abundancia normalizada del marcador de contaminación fecal crAssphage. Los parámetros del modelo fueron automáticamente seleccionados en función a su valor R^2 ajustado y su VIF (Variance inflation factor) para evitar multicolinealidad entre las variables ambientales. Los números en paréntesis representan el porcentaje de variación explicada por el eje y los parámetros que están significativamente relacionados con el eje se muestran con: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, y *** $p < 0.0001$. Los puntos de muestreo relacionados entre sí se muestran englobados dentro de un círculo púrpura. La abundancia de GRAs e int11 se representan con flechas azules; la dirección de las flechas indica el incremento de la abundancia de los genes. El ángulo de las flechas con respecto al eje representa la relación lineal de la abundancia de los genes con el PC, y el círculo naranja muestra las variables más importantes (int11, sul1, sul2, bla_{OXA-2}, tetA). A lo largo del PC1, la abundancia de int11 y los GRAs incrementa hacia la derecha. S: sedimentos; W: agua.

Un análisis de redes basado en correlaciones múltiples de Spearman fue utilizado para evaluar la relación entre la composición de la comunidad microbiana, los GRAs encontrados y las variables ambientales. La abundancia relativa a nivel de género en comunidades microbianas fue explorada en relación a la abundancia de los GRAs para buscar patrones de coocurrencia que sugieran cuales podrían ser los microorganismos que cargan los GRAs y que parámetros ambientales favorecerían su presencia. Seis géneros de bacterias mostraron correlaciones positivas y significativas con varios GRAs (Fig. 13). *Hydrogenophaga*, *Flavobacterium* y *Gemmobacter* mostraron correlación positiva con *sul1*, *tetA*, e *intl1*, a su vez todos estos genes mostraron correlaciones significativas entre ellos y con la abundancia de crAssphage. Ninguna variable ambiental mostró correlación positiva con la abundancia de GRAs o con algún grupo taxonómico en particular, con la excepción del pH que presentó correlación positiva con *Methanosarcina*.

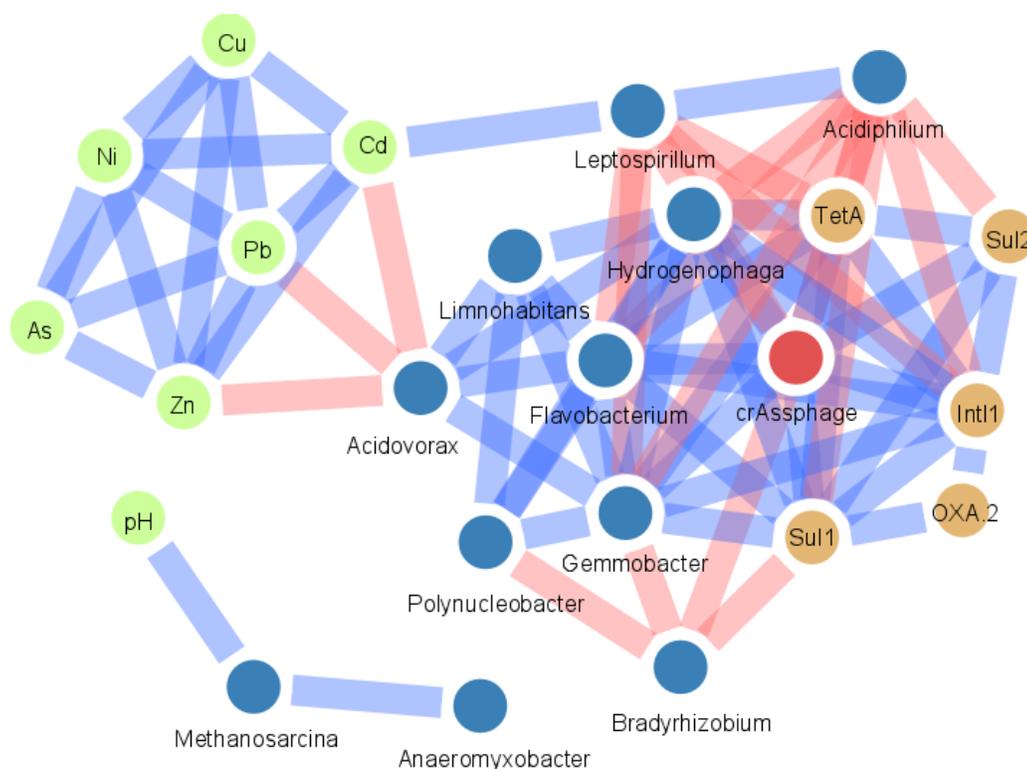


Figura 13. Relación entre composición de la comunidad microbiana, abundancia de genes y variables ambientales. Análisis de redes basado en correlaciones múltiples de Spearman para la visualización de los patrones de coocurrencia de los grupos taxonómicos, los genes cuantificados y las variables ambientales analizadas. Solo las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) fueron incluidas en el gráfico.

Las correlaciones son representadas como enlaces entre los nodos, los enlaces azules representan correlaciones positivas, mientras que los enlaces rojos representan las correlaciones negativas. Los nodos representan los grupos taxonómicos asignados a nivel de genero (azul), GRAs e *intl1* (naranja), crAssphage (rojo), y las variables ambientales (verde).

Análisis microbiológico de aguas residuales y resistencia fenotípica a antibióticos.

Para evaluar los efectos de la contaminación fecal en las aguas de Uru Uru, las muestras de agua del lago fueron analizadas buscando la presencia de bacterias coliformes totales y *E. coli*. La presencia de coliformes totales fue evaluada mediante ensayo de fermentación en tubos múltiples, en medio Lauril triptosa con tubos Durham para evaluar la producción de gases por la fermentación láctica, mientras que la presencia de *E. coli* fue evaluada partiendo de los tubos con signos de fermentación como inóculo para el cultivo en caldo EC MUG, evaluando el crecimiento, mediante turbidez, fermentación y fluorescencia bajo luz UV (APHA 2017). La densidad de bacterias coliformes totales y *E. Coli* fue estimada mediante NMP. La muestra con mayor densidad de coliformes totales y también de *E. coli* fue la correspondiente al punto UP2 en el canal Tagarete que drena las aguas servidas de la ciudad de Oruro al lago Uru Uru (Fig. 14).

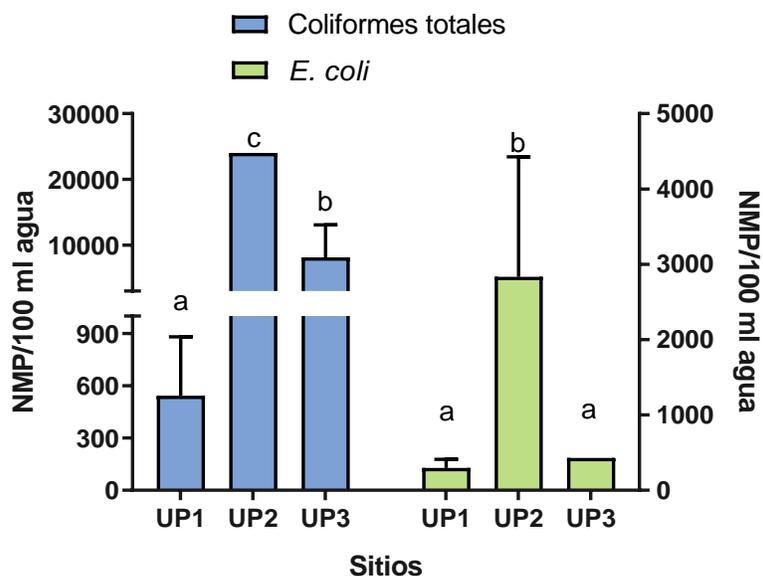


Figura 14. Presencia y densidad de coliformes totales y *E. coli*. La densidad de bacterias coliformes totales (izquierda) y de *E. coli* (derecha) en agua fue estimada mediante la técnica de Numero Mas Probable (NMP). El sitio con mayor densidad bacteriana fue el canal Tagarete (UP2). Las letras cuando diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), la media de la densidad expresada en NMP por 100 ml de agua está representada como barras, mientras que la desviación estándar se encuentra representada con barras de error.

Con la finalidad de aislar bacterias para analizar sus patrones de resistencia fenotípica, 300 mL de agua fueron filtrados a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 45 μm de diámetro (ThermoFisher). Un 1/8 de la membrana fue introducida en caldo LB que fue cultivado por una noche a 35°C, 100 μL fueron transferidos a placas de agar Mac Conkey (Difco) y CHROMAgar (CHROMagar™). Después de incubar las placas por una noche a 35°C, un aproximado de 10 colonias por placa fueron aisladas al azar de cada muestra. Las colonias fueron enriquecidas en caldo LB y almacenadas con glicerol (15%) a -80°C. Se aislaron 143 colonias en total. Las colonias bacterianas recuperadas de las muestras de agua fueron cultivadas en medio *Chromogenic Coliform Agar* (ThermoFisher), con la finalidad de distinguir coliformes totales y *E. coli*. Las colonias que mostraron coloración azul oscuro fueron consideradas como *E. coli*. En total se recuperaron 34 colonias de *E. coli* (18 colonias de UP1, 7 colonias de UP2 y 9 colonias de UP3).

De entre todas las colonias aisladas, las colonias de *E. coli* recuperadas fueron sometidas a el ensayo de PhenePlates, para la su caracterización fenotípica basada en sus capacidades bioquímicas de degradación de 11 carbohidratos distintos. Basados en los datos obtenidos en el ensayo, un dendrograma fue construido comparando los fenotipos bioquímicos de las cepas analizadas (Fig. 15). Las placas fueron fotografiadas y las imágenes y los datos fueron recolectados y analizados empleando el software: PhP software (BioSys inova, Stockholm). Las cepas que presentaron fenotipos bioquímicos muy similares fueron asignadas como diferentes clones de una misma cepa. Las bacterias también fueron analizadas mediante las placas de AREB para evaluar su susceptibilidad a 9 antibióticos distintos. Las cepas fueron caracterizadas como susceptibles, resistentes o intermedios en función al crecimiento que presentaron en cada pozo luego de ser incubadas toda una noche a 37°C. Solo 2 de las 18 *E. coli* aisladas en UP1 presentaron resistencia a un antibiótico (cefpodoxima), mientras que 5 de las 7 *E. coli* recuperadas de UP2 presentaron resistencias, dos de ellas resistentes a 3 antibióticos. 4 de las 9 cepas aisladas de UP3 mostraron resistencias, 2 de estas fueron identificadas como clones de una misma cepa, y presentaron el mismo patrón de resistencia (ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprim) (Fig. 15). El índice MAR (*Multiple Antibiotic Resistance index*) fue calculado para cada sitio, UP1 presento el MAR más bajo (0.01), seguido de UP2 (0.14), mientras que UP3 presentó más elevado (0.2).

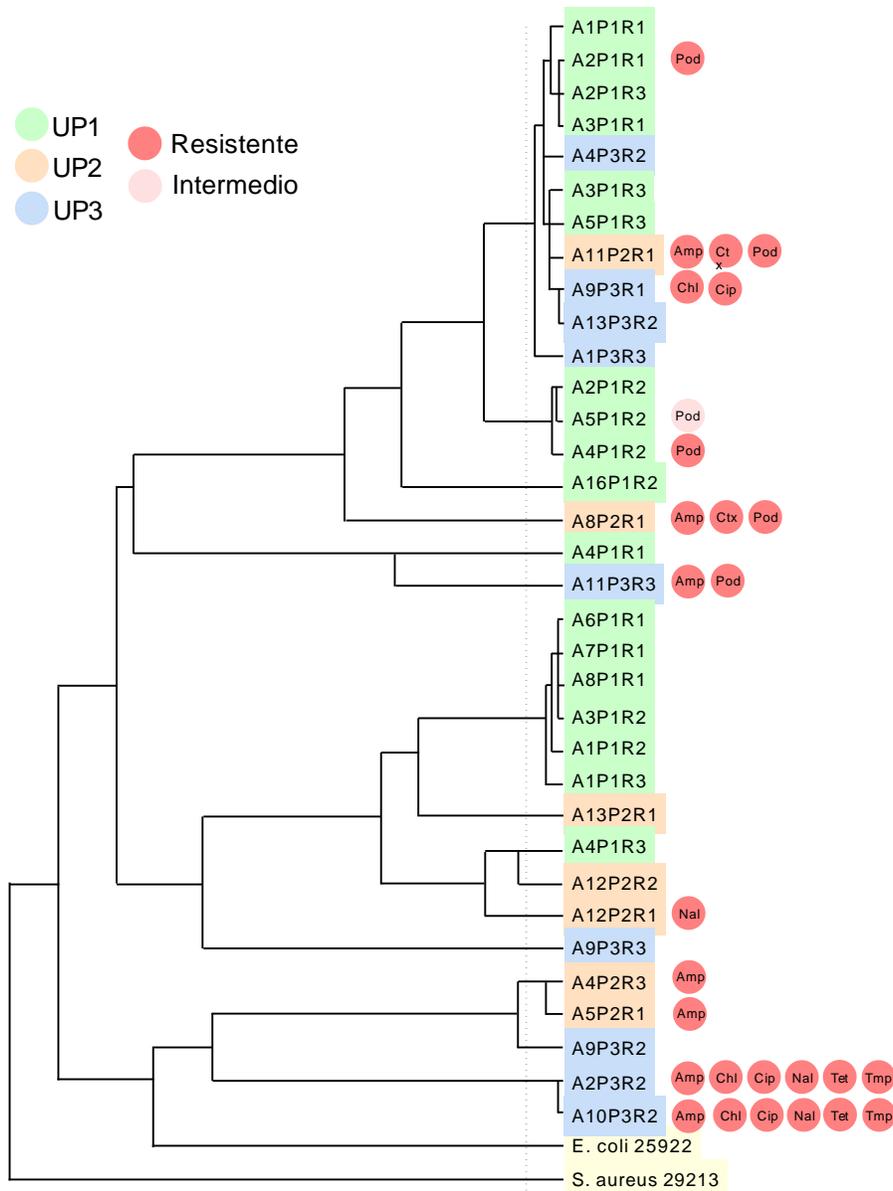
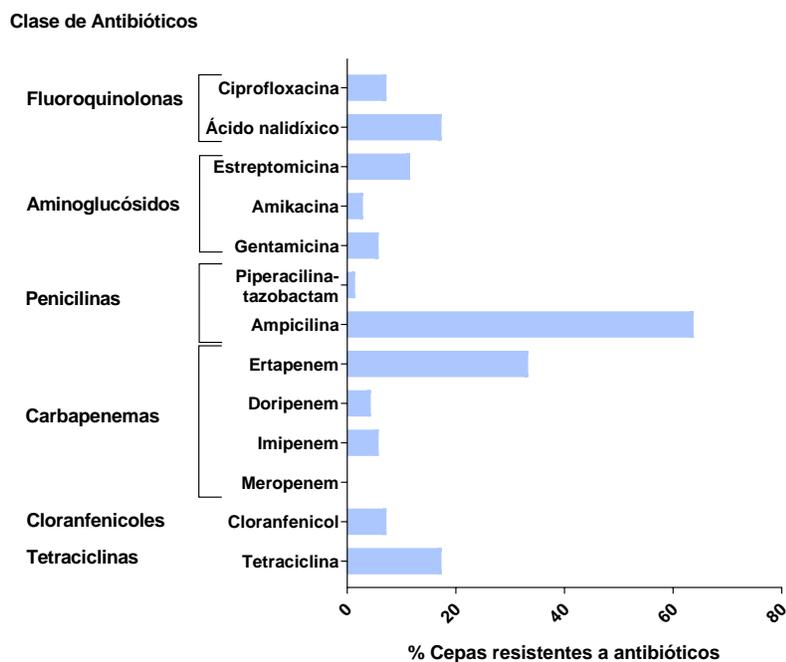


Figura 15 Dendrograma de las cepas *E. coli* aisladas de las muestras de aguas residuales. El dendrograma fue construido basado en el fingerprinting bioquímico de las cepas, obtenido en con el sistema PhenePlate. Las bifurcaciones en el dendrograma al lado derecho de la line punteada son consideradas como clones de una misma cepa. La caracterización de la resistencia a antibióticos se realizó empleando el sistema de placas AREB. Las resistencias a antibióticos que posee cada cepa están representadas en círculos al lado derecho del código de las cepas. Amp: ampicilina; Chl: cloranfenicol; Cip: ciprofloxacina; Ctx: cefotaxima; Nal: ácido nalidíxico; Pod: cefpodoxima; Tet: tetraciclina; Tmp: Trimetroprin.

Adicionalmente 69 cepas (UP1 20 cepas, UP2 26 y UP3 23) fueron seleccionadas al azar de entre todos los aislados (*E. coli* incluidas) para evaluar sus patrones de resistencia a antibióticos mediante ensayo de difusión de discos. 13 antibióticos fueron analizados. Mas del 60% de las cepas analizadas mostraron resistencia a ampicilina (Fig. 16a), 33.3% de las cepas mostraron resistencia a Ertapenem. Mientras que el 17.39% fueron resistentes a tetraciclina y ácido nalidíxico. EL MAR fue de 0.136 para todas las cepas en general, 0.104 para UP1, 0.175 para UP2 y 0.120 para las cepas aisladas de UP3. La mayoría de bacterias resistentes a ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico pertenecen a aislados de UP2 (Fig. 16b), mientras que la mayoría de cepas resistentes a ertapenem pertenecen a UP1.

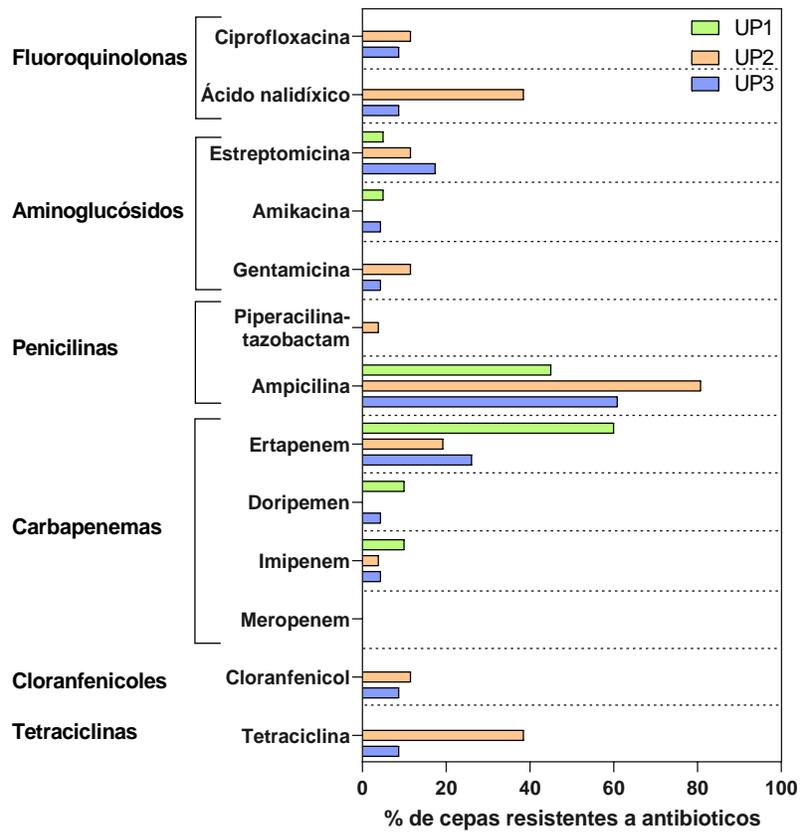
26 de las 69 cepas presentaron resistencia a al menos un antibiótico (Fig. 16c), 10 cepas mostraron resistencia a dos antibióticos, mientras que 17 cepas mostraron 3 o más resistencias, siendo encontradas solo 16 cepas susceptibles a todos los antibióticos incluidos en el análisis. El punto UP2 fue el punto con mayor número de cepas resistentes a 1, 4 y ≥ 5 antibióticos, siendo también, el punto con menor número de cepas susceptibles (Fig. 16d).

a.

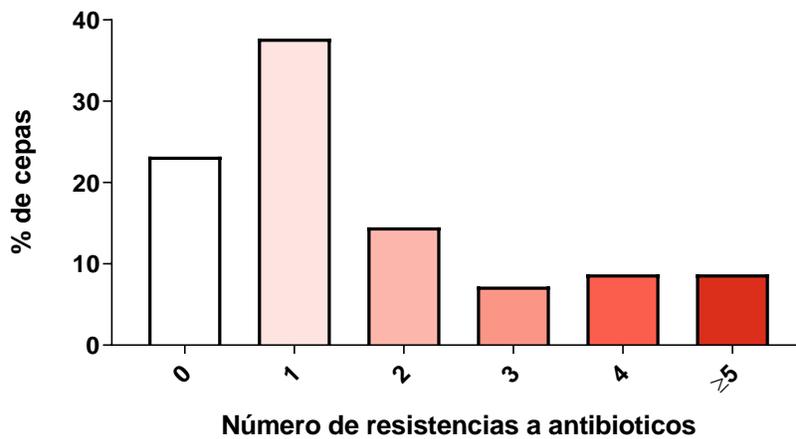


b.

Clase de antibióticos



c.



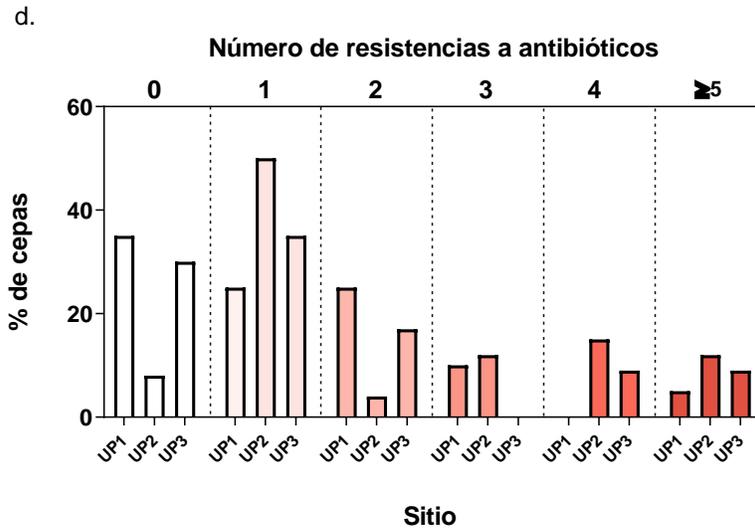


Figura 16. Resultados de los ensayos de difusión de discos Kirby-Bauer. La resistencia a antibióticos en las cepas aisladas de las muestras de aguas residuales fue analizada mediante ensayos de difusión de discos o antibiogramas. De todos los aislados un total de 69 cepas (incluidas algunas cepas de *E. coli*) fueron seleccionadas al azar (20 de UP1, 26 de UP2 y 23 de UP3), 13 antibióticos diferentes fueron empleados para evaluar los patrones de resistencia de las cepas. **a.** Porcentaje del total de cepas resistentes a cada antibiótico evaluado. **b.** Porcentaje de cepas resistentes a cada antibiótico por punto de muestreo en Uru Uru. **c.** Número total de cepas susceptibles, cepas con 1, 2, 3, 4, 5 o más resistencias. **d.** Numero de cepas analizadas susceptibles y resistentes a 2 o más antibióticos provenientes de cada punto de muestreo en el lago Uru Uru.

DISCUSIÓN

Con la finalidad de explorar la relación entre la polución por metales, las descargas de aguas residuales, y la composición de las comunidades microbianas con los GRAs, se analizó la abundancia de diferentes GRAs, el gen *intl1*, en tres cuerpos de agua. Pata Kotha (PK), una laguna glaciar considerado un ambiente ecológicamente intacto, con muy poca actividad antrópica alrededor. Al igual que PK, Milluni Chico (MC) otra laguna glaciar, pero fuertemente impactada por descargas mineras. Uru Uru es un lago periurbano que desde hace muchos años recibe tanto descargas mineras como descargas de aguas servidas. Los niveles algunos metales fueron medidos en las muestras de sedimento recolectadas, se

cuantifico el marcador molecular de contaminación fecal crAssphage junto con diferentes GRAs.

La ausencia de crAssphage en PK sugiere que la laguna tiene un carácter prístino, mientras que MC podría ser considerado un ambiente extremo. Las muestras de MC presentaron valores muy bajos de pH, alta CE y elevados niveles de metales (Figuras 3 y 4), características asociadas con sitios impactados por drenajes ácidos de mina (Gray 1996). Estas características eran esperadas, dado que actividades mineras a gran escala fueron realizadas en el área hasta 1990; desde entonces, solo pequeñas cooperativas mineras operan en el valle (Rios 1985). Nuestros resultados respaldan estudios anteriores que indican que las descargas de drenajes ácidos de mina en las aguas superficiales acidifican el agua e incrementan los niveles de metales (As, Fe, Cd, Zn, Cu, Sn) (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008). Milluni Chico es un ambiente extremo para la vida microbiana, a pesar de los cual en este sitio se detectaron 4 de los 14 GRAs analizados. Por otro lado, PK presentó bajos niveles de metales, un pH casi neutro y baja CE. La composición química de los sedimentos de PK es característica de los lagos naturales a grandes altitudes en las montañas de la región (Driesen 2012). La composición mineralógica del lugar explica los niveles de metales pesados hallados en las muestras (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008). El valle de Milluni tiene poca actividad antrópica además de las actividades mineras y la crianza de ganado camélido para subsistencia. Aunque crAssphage también puede ser detectado en aguas con contaminación fecal animal (APHA 2017, García-Aljaro *et al.* 2017), crAssphage no fue detectado en PK y MC (Figura 7). Esto podría deberse a las condiciones ambientales extremas que podría influenciar la sobrevivencia de los hospederos de crAssphage en el agua. En el caso de PK, la ausencia del marcador de contaminación fecal podría reflejar ya sea la ausencia de sus hospederos o el carácter prístino del lago.

Al igual que en estudios anteriores (Alanoca *et al.* 2016), Uru Uru un lago periurbano, se caracteriza por presentar CE elevada y pH alcalino (Figura 3). UP3 presentó los mayores niveles de metales entre todos los puntos, seguido de los puntos de muestreo de MC (Figura 4). Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que observaron que las descargas de desechos mineros y aguas servidas incrementaron la conductividad eléctrica y la concentración de metales y metaloides como el Hg, Fe, Mn, W, y Sb (Alanoca *et al.* 2016).

UP1, un punto que recibe agua de una vieja mina de oro a cielo abierto, transformada en un lago meromóctico, presentó niveles de metales más bajos que los obtenidos en MC. Esto podría explicar por qué la CE en UP1 es similar a los datos obtenidos para PK (Figura 3b) que es considerado prístino. En el canal Tagarete (UP2), los niveles de metales pesados fueron bajos, al igual que en PK. UP2 recibe las descargas de aguas residuales de la ciudad de Oruro y desemboca en la parte norte del lago Uru Uru (UP3). Consistente con las contribuciones fecales que reciben los puntos de muestreo, todas las muestras de Uru Uru (excepto UP1S) reportaron el marcador de contaminación fecal. Entonces, los puntos de muestreo están contaminados simultáneamente por descargas de aguas residuales y descargas mineras.

Se analizó la abundancia de 14 GRAs y el elemento genético móvil *intl1*. En general, 7 GRAs fueron detectados en las muestras, *intl1* fue detectado en todas ellas. Los genes con mayor abundancia fueron *intl1*, *bla_{OXA-2}*, *sul1* y *sul2*. Todos estos genes presentaron correlaciones positivas entre ellos (Figura 8). Comúnmente *intl1* puede ser encontrado en el ambiente correlacionado positivamente con varios GRAs (Zhu *et al.* 2017), su abundancia está fuertemente correlacionada con la abundancia de bacterias multirresistentes a antibióticos (Lucassen *et al.* 2019). *intl1* y *sul1* comúnmente se encuentran físicamente ligados en EGMs (Gillings *et al.* 2015, Uyaguari-Díaz *et al.* 2018). Anteriormente otro estudio reportó la presencia de *sul1* y *sul2* en el valle de Milluni, específicamente en Pata Khota. Cuando analizaron los niveles de sulfametoxazol en el agua, el antibiótico no fue detectado (Archundia *et al.* 2017) lo que sugiere que estos genes pueden presentarse de manera natural en las comunidades microbianas de estos ambientes acuáticos, tal cual ocurre en otros sitios prístinos (Storteboom *et al.* 2010, Ouyang *et al.* 2015, Van Goethem *et al.* 2018). Considerando que PK y MC tienen poca actividad antrópica alrededor, y que los niveles de sulfametoxazol fueron reportados como indetectables en uno de los sitios de estudio (Archundia *et al.* 2017) podemos asumir que los antibióticos no juegan un rol importante en Milluni. En el caso de Uru Uru, aunque no se cuantificaron los niveles de antibióticos en las muestras, anteriormente los niveles de eritromicina fueron reportados por debajo del límite de detección o en el orden de ng/g de sedimento en sitios cercanos a los puntos de muestreo UP1 y UP2 de manera respectiva (Guzman-Otazo *et al.* En preparación). Incluso si otros antibióticos podrían estar presentes, sus niveles podrían ser

residuales dado el efecto de dilución en grandes cuerpos de agua. Mas aun, evidencia reciente sugiere que las concentraciones residuales de antibióticos en el ambiente juegan un rol secundario con respecto a la contaminación fecal en la abundancia de GRA (Karkman *et al.* 2019).

Algunos estudios mostraron que metales como el Cu, Zn, Cd y el Ni podrían ejercer fuertes presiones selectivas sobre las comunidades microbianas en el ambiente favoreciendo la selección de bacterias resistentes a antibióticos, siendo su efecto mayor al de los propios antibióticos (Stepanauskas *et al.* 2006, Song *et al.* 2017). Incluso cuando los niveles de metales detectados en MC fueron mayores a los detectados en PK, estas lagunas presentan abundancias de GRAs similares, agrupándose juntas de acuerdo al clúster jerárquico (Figura 7). Los metales mostraron una débil correlación con la abundancia de GRAs e *intl1* en la prueba de Mantel, mientras que el análisis de PCA junto con el modelo lineal mostró que los metales considerados en el estudio no influyen directamente sobre la abundancia de GRAs (Figura 12), en tanto que el análisis de redes no halló ninguna relación entre la composición de las comunidades microbianas en las muestras y los niveles de metales pesados (Figura 13). Todos los metales al presentar correlaciones positivas entre ellos (Figura 6) formaron una red de nodos separada y sin correlaciones positivas con la red de grupos taxonómicos y GRAs. La ausencia de correlaciones positivas entre metales y grupos taxonómicos podría deberse a que la contaminación por metales en altas concentraciones y a largo plazo reduce la diversidad y la biomasa microbiana (Chen *et al.* 2018). Hemme *et al.* (2010) analizaron comunidades microbianas en aguas subterráneas expuestas prolongadamente (~ 50 años) a concentraciones elevadas de metales resulta en una comunidad microbiana con baja diversidad filogenética, con apenas 13 OTUs, con 2 o 3 poblaciones clonales conformando la mayor parte de la comunidad (Hemme *et al.* 2010). Esto concuerda con lo encontrado en las muestras de MC, que presentan valores de diversidad, medidos según el índice de Shannon, significativamente menores (Figura 9c), y donde la mayor parte de la comunidad microbiana está dominada por tres taxas (Figura 8): *Burkholderiales* bacterium GJ-E10, una betaproteobacteria quimiolitautótrofa con capacidad de oxidar hierro, previamente aislada de sedimentos ácidos de un río de Japón, capaz de crecer en condiciones acidófilas entre pH 2.2 y 3.5 (Fukushima *et al.* 2015); *Leptospirillum ferrooxidans* una bacteria del filo Nitrospirae, quimiolitautótrofa,

oxidadora de hierro y acidófila, aislada en cenizas volcánicas en Japón. Otro taxon importante hallado en MC es *Thiomonas* sp. X19, perteneciente al orden Burkholderiales y anteriormente aislada de drenajes ácidos de mina en Francia (Arsene-Ploetze *et al.* 2018). Es importante destacar que estos organismos a pesar de ser extremófilos aun podrían actuar como reservorios GRAs en el ambiente, por ejemplo, homólogos de genes que confieren resistencia a gentamicina, y kanamicina fueron hallados en EGMs en *Thiomonas* sp. X19 (Arsene-Ploetze *et al.* 2018), esto podría explicar la presencia de cuatro GRAs en MC a pesar de sus condiciones ambientales extremas.

Estudios anteriores reportaron correlaciones positivas entre crAssphage y muchos GRAs (Chen *et al.* 2019, Karkman *et al.* 2019, Stachler *et al.* 2019). El análisis de clúster jerárquico (Figura 7) mostró que las muestras de Uru Uru fueron agrupadas juntas basado en la presencia de crAssphage y los valores más elevados de la mayoría de los GRAs. Aunque se encontró una correlación positiva pero no estadísticamente significativa entre la abundancia de los GRAs y crAssphage (Figura 8), las muestras afectadas por contaminación fecal presentaron mayor abundancia de *intl1*, *sul1*, *sul2*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA* comparadas con las muestras en las que no se detectó el marcador de contaminación fecal (Figura 10). Mas aun, todos estos genes presentaron fuertes correlaciones positivas entre ellos (Figura 8) lo que podría indicar que todos provienen de una misma fuente. La influencia de la contaminación fecal se evidencio claramente al encontrar el gen *acc-3* exclusivamente en el canal Tagarete (UP2). Este gen es esta comúnmente asociado con patógeno humano oportunista *Hafnia alvei*, que comúnmente se encuentra en las heces de humanos y animales, suelo, agua y aguas residuales (Girlich *et al.* 2000, Romanowska 2000). La prueba de Mantel también identifico la abundancia del marcador de contaminación fecal como un factor determinante de la abundancia de GRAs. En conjunto, todos estos resultados sugieren que las descargas fecales, podrían ser fuente importante de GRAs en nuestras muestras. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que emplearon crAssphage como marcador molecular para rastrear las la contaminación fecal humana en ambientes acuáticos (García-Aljaro *et al.* 2017, Stachler *et al.* 2018) y un indicador capaz de predecir la presencia de GRAs en ambientes acuáticos impactados por la descarga de aguas residuales (Chen *et al.* 2019, Stachler *et al.* 2019).

Los resultados del análisis de PCA de la abundancia de *intl1* y los GRAs mostró que el PC1 (69.5% de la variación) presento una fuerte relación linear con la abundancia de *intl1*, *sull*, *sul2*, *bla_{OXA-2}*, y *tetA*. Un modelo linear (Lm) multiparamétrico reveló que los factores más importantes explicando la variación en el PC1 fueron la CE, un pH neutral, y la abundancia de crAssphage, el pH y la abundancia del crAssphage correlacionan positivamente con la abundancia de GRAs. La CE es un indicador del impacto de actividades antrópicas, ya que la CE incrementa gracias a actividades como la minería y las descargas de aguas residuales (Gray 1996, Pal *et al.* 2015). El pH es uno de los factores más importantes que influyen la composición microbiana en los suelos (Lauber *et al.* 2009, Bahram *et al.* 2018), por ejemplo, se sabe que la toxicidad y la biodisponibilidad de los metales depende de su solubilidad, la cual incrementa a pH bajo (Seiler & Berendonk 2012). Mas aun, la composición de la comunidad microbiana es el factor más importante determinando el resistoma de los suelos a escala continental (Forsberg *et al.* 2014). La prueba de Mantel reveló que existe correlación entre la composición de las comunidades microbianas y la abundancia de GRAs, el análisis de redes mostró que *intl1*, *sull* y *tetA* presentan un patrón de coocurrencia con los géneros *Hydrogenophaga*, *Gemmobacter*, y *flavobacterium*, a su vez tanto estos géneros como los genes coocurren con crAssphage (Figura 10), estas relaciones fueron corroboradas mediante prueba de Mantel, que mostró que tanto la abundancia de *intl1*, los GRAs y la abundancia de crAssphage están correlacionadas con la composición de las comunidades microbianas. Anteriormente Zhou *et al.* (2017) encontraron correlaciones significativas entre la abundancia relativa de *Arcobacter*, *Burkholderia*, *Dechloromonas*, *Hydrogenophaga*, *Acidovorax*, *Cloacibacterium*, *Pretovtella*, *Paludibacter* y *Bacteroides* con genes de resistencia a aminoglicósidos, β -lactamasas, MLSB, sulfonamidas, y tetraciclina en muestras de agua colectadas en un río urbano en China. La familia enterobacteriaceae fue detectada en todos los sitios analizados, con mayor abundancia relativa en las muestras de MC (Anexo 2), el analisis de redes a nivel de familia, mostró que este grupo no presenta correlaciones positivas significativas con ninguno de los genes o variables ambientales evaluados (Anexo 4). En el caso del pH solo el género *Methanosarcina* presentó correlación positiva con los valores de este (Figura 13), este género se presentó principalmente en las muestras de PK y UP1 (Figura 10), estando completamente ausente en MC la laguna de pH más bajo, la

prueba de Mantel no mostró correlaciones significativas entre el pH y la composición de las comunidades microbianas, pero sí entre esta última y la CE, que a su vez correlaciona negativamente con el pH. Es importante notar que el pH solamente fue medido en el agua en cada punto de muestreo. Aunque el pH del agua por encima de los sedimentos, no necesariamente es el mismo al de los sedimentos en ambientes acidificados (Herlihy & Mills 1986), estudios anteriores en la cuenca de Milluni (Salvarredy-Aranguren *et al.* 2008) reportaron valores de pH similares a los de este estudio en los sedimentos. La composición de las comunidades microbianas está relacionada con la abundancia de GRAs, y la abundancia del marcador de contaminación fecal crAssphage, y es posible que la CE, los niveles de metales, y el pH indirectamente condicionen el resistoma de las comunidades microbianas en sitios impactados por actividades mineras y descargas de aguas servidas.

El análisis microbiológico de los sitios impactados por descargas fecales, evidenció que UP2 es el punto más impactado por estas, siendo el punto con mayores niveles de coliformes totales y *E. coli* (Figura 14). Las bacterias aisladas del agua de estos puntos e identificadas como *E. coli* fueron evaluadas mediante PhenePlates y AREB-plates, estos análisis mostraron que muchas de las cepas aisladas parecen ser clones diferentes de una misma cepa. La mayoría de las cepas de *E. coli* fueron aisladas a partir de las muestras UP1 mientras que solo 8 y 6 cepas fueron identificadas como *E. coli* en UP3 y UP2 respectivamente, sin embargo, la mayoría de las bacterias aisladas de UP2 y UP3 mostraron patrones de multiresistencia en los ensayos AREB. En UP3 se encontraron 2 cepas (A2P3R2 y A10P3R2) cuyo patrón bioquímico sugiere que son clones, además, ambas cepas presentaron el mismo patrón de resistencia a 6 antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina, trimetoprima), lo que refuerza la idea de que se trata de dos clones de una misma cepa aislada repetidamente. De modo similar en UP2 se encontraron dos cepas *E. coli* multiresistentes (A11P2R1 y A8P2R1), ambas cepas presentan resistencia a 3 antibióticos (ampicilina, cefotaxima y cefpodixima), sin embargo, por su fenotipo bioquímico las cepas no son clonales, por lo que su patrón de multiresistencia podría deberse al tipo de plásmidos que circulan en las comunidades microbianas en UP2. En general, UP3 y UP2 presentaron un MAR mucho mayor al de UP1.

Más del 60% de las cepas analizadas mediante método de Kirby-Bauer de difusión de discos mostraron resistencia a ampicilina (figura 16a), alrededor del 17% de las cepas analizadas mostraron resistencia a tetraciclina y ácido nalidíxico y el 33% mostró resistencia a Ertapenem, una carbapenemasa de amplio espectro, pero de limitada actividad contra bacilos Gram-negativos no fermentativos (Shah & Isaacs 2003), por lo que este elevado porcentaje de resistencia podría deberse a que en el análisis se incluyeron tanto bacterias fermentativas como no-fermentativas.

Aproximadamente el 38% de las cepas presentaron una sola resistencia y otro 39% presentó resistencia a 2 o más antibióticos, en general el índice MAR fue igual a 0.14. El punto con mayor MAR fue UP2 (0.17) y el menor UP1 (0.1), lo que sugiere que la presencia de bacterias multiresistentes está ligada a la contaminación por aguas residuales y descargas fecales, siendo el sitio más impactado por estas el que mayor MAR presentó.

Nuestros resultados sugieren que la contaminación fecal fue el principal factor relacionado al incremento de la abundancia de *intl1* y los GRAs incluidos en este estudio. Nuestros resultados concuerdan con estudios recientes que señalan que la abundancia de GRAs, en casi todos los casos, está explicada por las contribuciones de descargas fecales humanas en ambientes impactados por actividades antrópicas y no por procesos de selección *in situ* (Karkman *et al.* 2019). Estudios anteriores mostraron que los metales en el ambiente ejercen presiones selectivas sobre las comunidades microbianas, que favorecen el incremento de la abundancia de GRAs (Baker-Austin *et al.* 2006, Gao *et al.* 2015, Zhao *et al.* 2016, Song *et al.* 2017, Zhao *et al.* 2019), nuestros resultados mostraron un ligero efecto de los metales sobre la abundancia de los GRAs lo que sugiere que procesos de selección *in situ* podrían aun estar jugando un rol importante en estos ambientes, pero siendo enmascarados por los efectos de las descargas fecales. El análisis microbiológico de las muestras de agua de sitios impactados por descargas fecales mostró que los sitios con mayor abundancia del marcador molecular *crAssphage*, son los sitios con mayor cantidad de coliformes totales y *E. coli*. Estas muestras también presentaron gran proporción de bacterias resistentes a antibióticos, sobre todo ampicilina y elevados índices de multiresistencia, apoyando los resultados que sugieren que las descargas fecales son las principales contribuyentes a la contaminación por bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia a antibióticos.

CONCLUSIONES

En general, nuestros resultados sugieren que la contaminación fecal es el factor más importante determinando la abundancia de los GRAs e *intl1* en ambientes acuáticos impactados tanto por descargas mineras y de aguas residuales. El pH, la CE y los metales influyen el resistoma de las comunidades microbianas de forma indirecta a través de la estructura de estas. Los niveles de metales en las muestras se encontraron en todos los casos por encima de la concentración mínima de co-selección, por lo que no puede descartarse por completo los procesos de co-selección *in situ*. Sin embargo, nuestros resultados sugieren fuertemente que las bacterias introducidas por las descargas de aguas residuales son suficientes para ocultar los efectos de dicha selección en el resistoma. Los sitios impactados por descargas fecales contienen no solo mayor abundancia de GRAs, sino que también presentan mayor porcentaje de cepas resistentes y multirresistentes a antibióticos, reafirmando la importancia de la contribución de las descargas fecales a la resistencia a antibióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agramont, J. 2018. Presencia de Genes de Resistencia a Antibióticos en las lagunas de la Cuenca de Milluni (La Paz, Bolivia). Universidad Mayor de San Andrés p.
- Alanoca, L., S. Guedron, D. Amouroux, S. Audry, M. Monperrus, E. Tessier, S. Goix, D. Acha, P. Seyler & D. Point. 2016. Synergistic effects of mining and urban effluents on the level and distribution of methylmercury in a shallow aquatic ecosystem of the Bolivian Altiplano. *Environ Sci Process Impacts* 18: 1550-1560.
- Alcock, B. P., A. R. Raphenya, T. T. Y. Lau, K. K. Tsang, M. Bouchard, A. Edalatmand, W. Huynh, A. V. Nguyen, A. A. Cheng, S. Liu, S. Y. Min, A. Miroshnichenko, H. K. Tran, R. E. Werfalli, J. A. Nasir, M. Oloni, D. J. Speicher, A. Florescu, B. Singh, M. Faltyn, A. Hernandez-Koutoucheva, A. N. Sharma, E. Bordeleau, A. C. Pawlowski, H. L. Zubyk, D. Dooley, E. Griffiths, F. Maguire, G. L. Winsor, R. G. Beiko, F. S. L. Brinkman, W. W. L. Hsiao, G. V. Domselaar & A. G. McArthur. 2020. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48: D517-d525.
- Amarasiri, M., D. Sano & S. Suzuki. 2020. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50: 2016-2059.
- APHA. 2017. 9225 DIFFERENTIATION OF COLIFORM BACTERIA. En: *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*.

- Archundia, D., C. Duwig, F. Lehembre, S. Chiron, M. C. Morel, B. Prado, M. Bourdat-Deschamps, E. Vince, G. F. Aviles & J. M. Martins. 2017. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Sci Total Environ* 576: 671-682.
- Arsene-Ploetze, F., O. Chiboub, D. Lievreumont, J. Farasin, K. C. Freel, S. Fouteau & V. Barbe. 2018. Adaptation in toxic environments: comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 1470-1483.
- Bahram, M., F. Hildebrand, S. K. Forslund, J. L. Anderson, N. A. Soudzilovskaia, P. M. Bodegom, J. Bengtsson-Palme, S. Anslan, L. P. Coelho, H. Harend, J. Huerta-Cepas, M. H. Medema, M. R. Maltz, S. Mundra, P. A. Olsson, M. Pent, S. Pölme, S. Sunagawa, M. Ryberg, L. Tedersoo & P. Bork. 2018. Structure and function of the global topsoil microbiome. *Nature* 560: 233-237.
- Baker-Austin, C., M. S. Wright, R. Stepanauskas & J. V. McArthur. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology* 14: 176-182.
- Baquero, F., J.-L. Martínez & R. Cantón. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 260-265.
- Berendonk, T. U., C. M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Burgmann, H. Sorum, M. Norstrom, M. N. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero & J. L. Martinez. 2015. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13: 310-317.
- Chen, H., X. Bai, Y. Li, L. Jing, R. Chen & Y. Teng. 2019. Source identification of antibiotic resistance genes in a peri-urban river using novel crAssphage marker genes and metagenomic signatures. *Water Res* 167: 115098.
- Chen, Y., Y. Jiang, H. Huang, L. Mou, J. Ru, J. Zhao & S. Xiao. 2018. Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the microbiome and functional genes in Yellow River sediments. *Science of The Total Environment* 637-638: 1400-1412.
- Chu, B. T. T., M. L. Petrovich, A. Chaudhary, D. Wright, B. Murphy, G. Wells & R. Poretsky. 2018. Metagenomics Reveals the Impact of Wastewater Treatment Plants on the Dispersal of Microorganisms and Genes in Aquatic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 84.
- CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. En. Wayne PA.
- Colque Navarro, P., H. Fernandez, R. Möllby, L. Otth, M. Tiodolf, M. Wilson & I. Kühn. 2014. Antibiotic resistance in environmental *Escherichia coli* - a simple screening method for simultaneous typing and resistance determination. *J Water Health* 12: 692-701.
- Culyba, M. J., C. Y. Mo & R. M. Kohli. 2015. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry* 54: 3573-3582.
- Deng, C., X. Liu, L. Li, J. Shi, W. Guo & J. Xue. 2020. Temporal dynamics of antibiotic resistant genes and their association with the bacterial community in a water-sediment mesocosm under selection by 14 antibiotics. *Environ Int* 137: 105554.

- Driesen, K. 2012. Contamination of surface waters by the former mining industry in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia) and the application of the water planning model WEAP. University College Ghent, Bélgica p.
- Dutilh, B. E., N. Cassman, K. McNair, S. E. Sanchez, G. G. Silva, L. Boling, J. J. Barr, D. R. Speth, V. Seguritan, R. K. Aziz, B. Felts, E. A. Dinsdale, J. L. Mokili & R. A. Edwards. 2014. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun* 5: 4498.
- Fang, Y., M. Xu, X. Chen, G. Sun, J. Guo, W. Wu & X. Liu. 2015. Modified pretreatment method for total microbial DNA extraction from contaminated river sediment. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 9: 444-452.
- Fick, J., H. Söderström, R. H. Lindberg, C. Phan, M. Tysklind & D. G. J. Larsson. 2009. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2522-2527.
- Forsberg, K. J., S. Patel, M. K. Gibson, C. L. Lauber, R. Knight, N. Fierer & G. Dantas. 2014. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature* 509: 612-616.
- Fukushima, J., F. Tojo, R. Asano, Y. Kobayashi, Y. Shimura, K. Okano & N. Miyata. 2015. Complete Genome Sequence of the Unclassified Iron-Oxidizing, Chemolithoautotrophic Burkholderiales Bacterium GJ-E10, Isolated from an Acidic River. *Genome Announc* 3.
- Gao, P., S. He, S. Huang, K. Li, Z. Liu, G. Xue & W. Sun. 2015. Impacts of coexisting antibiotics, antibacterial residues, and heavy metals on the occurrence of erythromycin resistance genes in urban wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 3971-3980.
- García-Aljaro, C., E. Ballesté, M. Muniesa & J. Jofre. 2017. Determination of crAssphage in water samples and applicability for tracking human faecal pollution. *Microbial biotechnology* 10: 1775-1780.
- Garrido, A. E., W. H. Strosnider, R. T. Wilson, J. Condori & R. W. Nairn. 2017. Metal-contaminated potato crops and potential human health risk in Bolivian mining highlands. *Environ Geochem Health*.
- Gillings, M. R., W. H. Gaze, A. Pruden, K. Smalla, J. M. Tiedje & Y.-G. Zhu. 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 9: 1269-1279.
- Gillings, M. R., M. Westoby & T. M. Ghaly. 2018. Pollutants That Replicate: Xenogenetic DNAs. *Trends Microbiol*.
- Girlich, D., T. Naas, S. Bellais, L. Poirel, A. Karim & P. Nordmann. 2000. Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44: 1470-1478.
- Graham, D. W., S. Olivares-Rieumont, C. W. Knapp, L. Lima, D. Werner & E. Bowen. 2011. Antibiotic Resistance Gene Abundances Associated with Waste Discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environmental Science & Technology* 45: 418-424.
- Gray, N. F. 1996. Field assessment of acid mine drainage contamination in surface and ground water. *Environmental Geology* 27: 358-361.

- Guedron, S., D. Point, D. Acha, S. Bouchet, P. A. Baya, E. Tessier, M. Monperrus, C. I. Molina, A. Groleau, L. Chauvaud, J. Thebault, E. Amice, L. Alanoca, C. Duwig, G. Uzu, X. Lazzaro, A. Bertrand, S. Bertrand, C. Barbraud, K. Delord, F. M. Gibon, C. Ibanez, M. Flores, P. Fernandez Saavedra, M. E. Ezpinoza, C. Heredia, F. Rocha, C. Zepita & D. Amouroux. 2017. Mercury contamination level and speciation inventory in Lakes Titicaca & Uru-Uru (Bolivia): Current status and future trends. *Environ Pollut* 231: 262-270.
- Gullberg, E., L. M. Albrecht, C. Karlsson, L. Sandegren & D. I. Andersson. 2014. Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals. *mBio* 5: e01918-01914-e01918-01914.
- Guzman-Otazo, J., L. Gonzales-Siles, V. Poma, J. Bengtsson-Palme, K. Thorell, C. F. Flach, V. Iniguez & A. Sjolting. 2019. Diarrheal bacterial pathogens and multi-resistant enterobacteria in the Choqueyapu River in La Paz, Bolivia. *PLOS ONE* 14: e0210735.
- Hemme, C. L., Y. Deng, T. J. Gentry, M. W. Fields, L. Wu, S. Barua, K. Barry, S. G. Tringe, D. B. Watson, Z. He, T. C. Hazen, J. M. Tiedje, E. M. Rubin & J. Zhou. 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *ISME J* 4: 660-672.
- Herlihy, A. T. & A. L. Mills. 1986. The pH regime of sediments underlying acidified waters. *Biogeochemistry* 2: 95-99.
- Jutkina, J., N. P. Marathe, C. F. Flach & D. G. J. Larsson. 2018. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of The Total Environment* 616-617: 172-178.
- Kang, W., Y. J. Zhang, X. Shi, J. Z. He & H. W. Hu. 2018. Short-term copper exposure as a selection pressure for antibiotic resistance and metal resistance in an agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res Int.*
- Karkman, A., T. T. Do, F. Walsh & M. P. J. Virta. 2018. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends Microbiol* 26: 220-228.
- Karkman, A., K. Pärnänen & D. G. J. Larsson. 2018. Fecal pollution explains antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *bioRxiv.*
- Karkman, A., K. Pärnänen & D. G. J. Larsson. 2019. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun* 10: 80.
- Knapp, C. W., S. M. McCluskey, B. K. Singh, C. D. Campbell, G. Hudson & D. W. Graham. 2011. Antibiotic Resistance Gene Abundances Correlate with Metal and Geochemical Conditions in Archived Scottish Soils. *PLOS ONE* 6: e27300.
- Kristiansson, E., J. Fick, A. Janzon, R. Grabic, C. Rutgersson, B. Weijdegård, H. Söderström & D. G. J. Larsson. 2011. Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE* 6: e17038.
- Larsson, D. G., C. de Pedro & N. Paxeus. 2007. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *J Hazard Mater* 148: 751-755.
- Lauber, C. L., M. Hamady, R. Knight & N. Fierer. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111-5120.

- Liu, J., M. Yin, X. Luo, T. Xiao, Z. Wu, N. Li, J. Wang, W. Zhang, H. Lippold, N. S. Belshaw, Y. Feng & Y. Chen. 2019. The mobility of thallium in sediments and source apportionment by lead isotopes. *Chemosphere* 219: 864-874.
- Llor, C. & L. Bjerrum. 2014. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Therapeutic Advances in Drug Safety* 5: 229-241.
- Lucassen, R., L. Rehberg, M. Heyden & D. Bockmühl. 2019. Strong correlation of total phenotypic resistance of samples from household environments and the prevalence of class 1 integrons suggests for the use of the relative prevalence of int1 as a screening tool for multi-resistance. *PLOS ONE* 14: e0218277.
- Marathe, N. P., V. R. Regina, S. A. Walujkar, S. S. Charan, E. R. B. Moore, D. G. J. Larsson & Y. S. Shouche. 2013. A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria. *PLOS ONE* 8: e77310.
- Marti, E., E. Variatza & J. L. Balcazar. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol* 22: 36-41.
- Matuschek, E., D. F. J. Brown & G. Kahlmeter. 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20: O255-O266.
- Navarro, M. C., C. Pérez-Sirvent, M. J. Martínez-Sánchez, J. Vidal, P. J. Tovar & J. Bech. 2008. Abandoned mine sites as a source of contamination by heavy metals: A case study in a semi-arid zone. *Journal of Geochemical Exploration* 96: 183-193.
- Nesme, J., S. Cecillon, T. O. Delmont, J. M. Monier, T. M. Vogel & P. Simonet. 2014. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr Biol* 24: 1096-1100.
- Nolvak, H., M. Truu & J. Truu. 2012. Evaluation of quantitative real-time PCR workflow modifications on 16S rRNA and tetA gene quantification in environmental samples. *Sci Total Environ* 426: 351-358.
- Ouyang, W.-Y., F.-Y. Huang, Y. Zhao, H. Li & J.-Q. Su. 2015. Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99: 5697-5707.
- Pal, M., N. Samal, P. Roy & M. Biswas Roy. 2015. Electrical Conductivity of Lake Water as Environmental Monitoring –A Case study of Rudra sagar Lake. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*.
- Paruch, L., A. M. Paruch, H. G. Eiken & R. Sørheim. 2019. Faecal pollution affects abundance and diversity of aquatic microbial community in anthropo-zoogenically influenced lotic ecosystems. *Sci Rep* 9: 19469.
- Poma, V., N. Mamani & V. Iñiguez. 2016. Impact of urban contamination of the La Paz River basin on thermotolerant coliform density and occurrence of multiple antibiotic resistant enteric pathogens in river water, irrigated soil and fresh vegetables. *SpringerPlus* 5.
- Quaghebeur, W., R. E. Mulhern, S. Ronsse, S. Heylen, H. Blommaert, S. Potemans, C. Valdivia Mendizábal & J. Terrazas García. 2019. Arsenic contamination in rainwater harvesting

- tanks around Lake Poopó in Oruro, Bolivia: An unrecognized health risk. *Science of The Total Environment* 688: 224-230.
- R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. En, Vienna, Austria.
- Rios, C. 1985. Estudio de la Contaminación Ambiental por las Descargas Mineras de Comsur en la Represa Milluni. Universidad Mayor de San Andres, La Paz, Bolivia. p.
- Romanowska, E. 2000. Immunochemical aspects of *Hafnia alvei* O antigens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 27: 219-225.
- Rosas, I., E. Salinas, L. Martínez, A. Cruz-Córdova, B. González-Pedrajo, N. Espinosa & C. F. Amábile-Cuevas. 2015. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from an Urban Lake Receiving Water from a Wastewater Treatment Plant in Mexico City: Fecal Pollution and Antibiotic Resistance. *Current Microbiology* 71: 490-495.
- Salvarredy-Aranguren, M. M., A. Probst, M. Roulet & M.-P. Isaure. 2008. Contamination of surface waters by mining wastes in the Milluni Valley (Cordillera Real, Bolivia): Mineralogical and hydrological influences. *Applied Geochemistry* 23: 1299-1324.
- Satgé, F., Y. Hussain, A. Xavier, R. P. Zolá, L. Salles, F. Timouk, F. Seyler, J. Garnier, F. Frappart & M.-P. Bonnet. 2019. Unraveling the impacts of droughts and agricultural intensification on the Altiplano water resources. *Agricultural and Forest Meteorology* 279: 107710.
- Seiler, C. & T. Berendonk. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Shah, P. M. & R. D. Isaacs. 2003. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 538-542.
- Song, J., C. Rensing, P. E. Holm, M. Virta & K. K. Brandt. 2017. Comparison of Metals and Tetracycline as Selective Agents for Development of Tetracycline Resistant Bacterial Communities in Agricultural Soil. *Environ Sci Technol* 51: 3040-3047.
- Stachler, E., B. Akyon, N. A. de Carvalho, C. Ference & K. Bibby. 2018. Correlation of *crAssphage* qPCR Markers with Culturable and Molecular Indicators of Human Fecal Pollution in an Impacted Urban Watershed. *Environmental Science & Technology* 52: 7505-7512.
- Stachler, E., K. Crank & K. Bibby. 2019. Co-Occurrence of *crAssphage* with Antibiotic Resistance Genes in an Impacted Urban Watershed. *Environmental Science & Technology Letters* 6: 216-221.
- Stalder, T., O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot & M.-C. Ploy. 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Stepanuskas, R., T. C. Glenn, C. H. Jagoe, R. C. Tuckfield, A. H. Lindell, C. J. King & J. V. McArthur. 2006. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environmental Microbiology* 8: 1510-1514.
- Storteboom, H., M. Arabi, J. G. Davis, B. Crimi & A. Pruden. 2010. Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, And Pristine Sources. *Environmental Science & Technology* 44: 7397-7404.
- Taylor, N. G., D. W. Verner-Jeffreys & C. Baker-Austin. 2011. Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance? *Trends Ecol Evol* 26: 278-284.

- U.S. Department of Health and Human Services, C. f. D. C. a. P. 2019. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.
- Uyaguari-Díaz, M. I., M. A. Croxen, Z. Luo, K. I. Cronin, M. Chan, W. N. Baticados, M. J. Nesbitt, S. Li, K. M. Miller, D. Dooley, W. Hsiao, J. L. Isaac-Renton, P. Tang & N. Prystajeky. 2018. Human Activity Determines the Presence of Integron-Associated and Antibiotic Resistance Genes in Southwestern British Columbia. *Frontiers in Microbiology* 9: 852-852.
- Van Goethem, M. W., R. Pierneef, O. K. I. Bezuidt, Y. Van De Peer, D. A. Cowan & T. P. Makhwanyane. 2018. A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome* 6: 40.
- von Wintersdorff, C. J. H., J. Penders, J. M. van Niekerk, N. D. Mills, S. Majumder, L. B. van Alphen, P. H. M. Savelkoul & P. F. G. Wolfs. 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. 7.
- Wright, M. S., C. Baker-Austin, A. H. Lindell, R. Stepanauskas, H. W. Stokes & J. V. McArthur. 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *The ISME Journal* 2: 417-428.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen & T. L. Madden. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.
- Zamora Echenique, G., J. Mata Parelo & R. Quezada H. 2018. Propuesta de "Geoparque Oruro – Bolivia" Alternativa para la preservación del patrimonio geológico, minero y sociocultural. *REV. MAMYM*: 19 - 33.
- Zhang, Z., Y. Qu, S. Li, K. Feng, S. Wang, W. Cai, Y. Liang, H. Li, M. Xu, H. Yin & Y. Deng. 2017. Soil bacterial quantification approaches coupling with relative abundances reflecting the changes of taxa. *Sci Rep* 7: 4837.
- Zhao, Y., T. Cocerva, S. Cox, S. Tardif, J.-Q. Su, Y.-G. Zhu & K. K. Brandt. 2019. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of The Total Environment* 656: 512-520.
- Zhao, Z., J. Wang, Y. Han, J. Chen, G. Liu, H. Lu, B. Yan & S. Chen. 2016. Nutrients, heavy metals and microbial communities co-driven distribution of antibiotic resistance genes in adjacent environment of mariculture. *Environmental Pollution*.
- Zhou, Z.-C., J. Zheng, Y.-Y. Wei, T. Chen, R. A. Dahlgren, X. Shang & H. Chen. 2017. Antibiotic resistance genes in an urban river as impacted by bacterial community and physicochemical parameters. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 23753-23762.
- Zhu, Y.-G., T. A. Johnson, J.-Q. Su, M. Qiao, G.-X. Guo, R. D. Stedtfeld, S. A. Hashsham & J. M. Tiedje. 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 3435-3440.
- Zhu, Y.-G., Y. Zhao, B. Li, C.-L. Huang, S.-Y. Zhang, S. Yu, Y.-S. Chen, T. Zhang, M. R. Gillings & J.-Q. Su. 2017. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes. *Nature Microbiology* 2: 16270.

ANEXOS

ANEXO 1

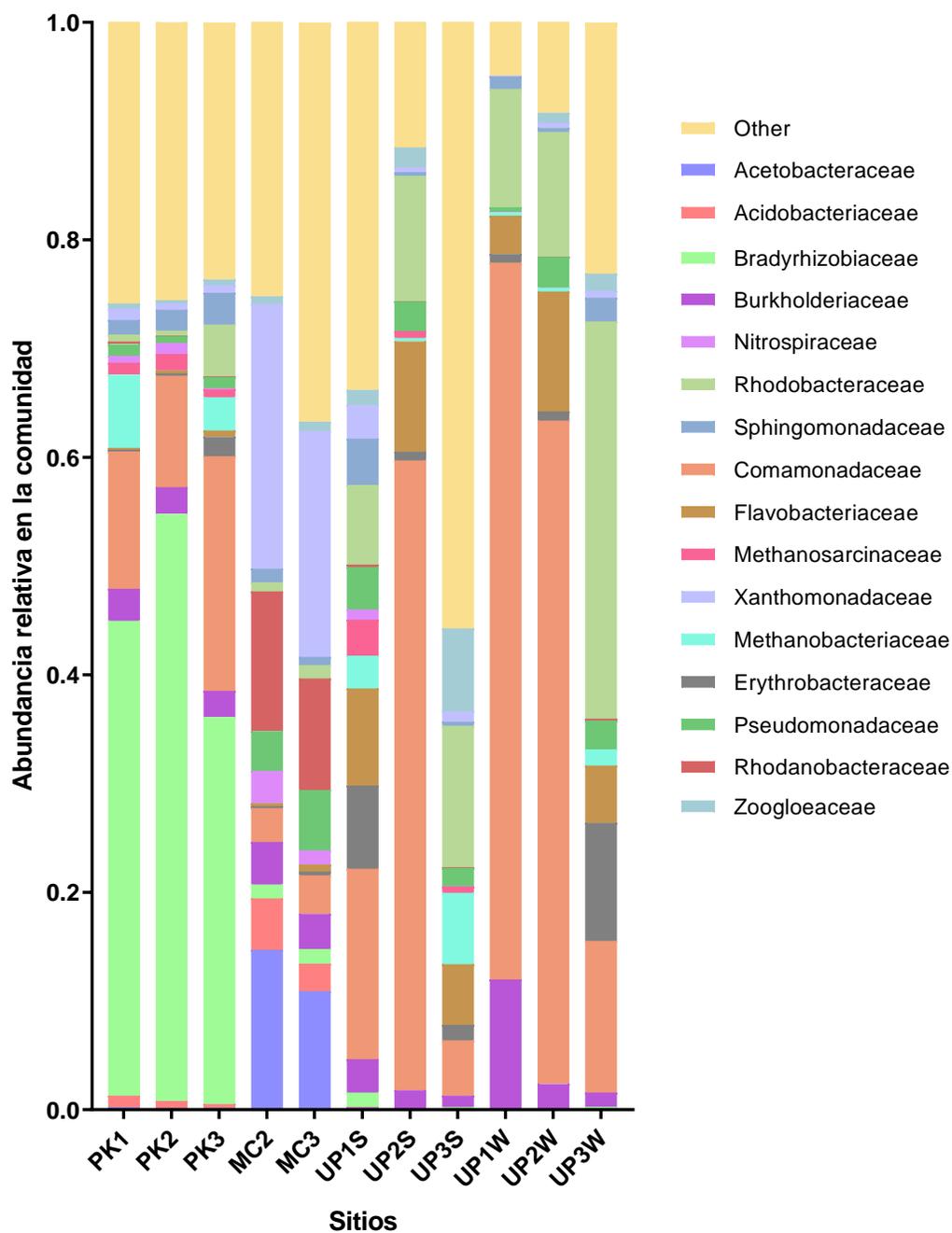
Tabla de Numero Mas probable (NMP) para series de tres tubos.

| Numero de tubos que dan reacci3n positiva entre: | | | NMP organismos/100 mL | Intervalo de confianza | | | |
|--|--------------|----------------|-----------------------|------------------------|-----|-------|-----|
| 3 tubos 10 mL | 3 tubos 1 mL | 3 tubos 0.1 mL | | a 95% | | a 99% | |
| 0 | 0 | 0 | < 3 | | | | |
| 0 | 0 | 1 | 3 | < 1 | 17 | < 1 | 23 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | < 10 | 17 | < 1 | 23 |
| 0 | 2 | 0 | 6.2 | 2 | 23 | 1 | 29 |
| 1 | 0 | 0 | 3.6 | 1 | 21 | < 1 | 28 |
| 1 | 0 | 1 | 7.2 | 2 | 27 | 1 | 35 |
| 1 | 1 | 0 | 7.3 | 2 | 28 | 1 | 36 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 4 | 34 | 2 | 43 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 4 | 35 | 2 | 44 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 6 | 41 | 4 | 51 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 6 | 42 | 4 | 52 |
| 2 | 0 | 0 | 9.1 | 2 | 38 | 1 | 50 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 5 | 48 | 3 | 62 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 5 | 50 | 3 | 65 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 8 | 61 | 5 | 77 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 8 | 63 | 5 | 80 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 11 | 75 | 7 | 93 |
| 2 | 3 | 0 | 29 | 12 | 78 | 8 | 97 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 7 | 129 | 4 | 177 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 10 | 180 | 10 | 230 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 20 | 230 | 10 | 290 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 20 | 210 | 10 | 290 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 20 | 280 | 20 | 370 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 40 | 350 | 20 | 450 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 30 | 390 | 20 | 620 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 50 | 510 | 30 | 650 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|--------|-----|------|-------|------|
| 3 | 2 | 2 | 210 | 80 | 540 | 50 | 820 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | 120 | 800 | 80 | 990 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 100 | 1400 | < 100 | 1900 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 200 | 2400 | 100 | 3200 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 300 | 4800 | 200 | 6400 |
| 3 | 3 | 3 | > 2400 | | | | |

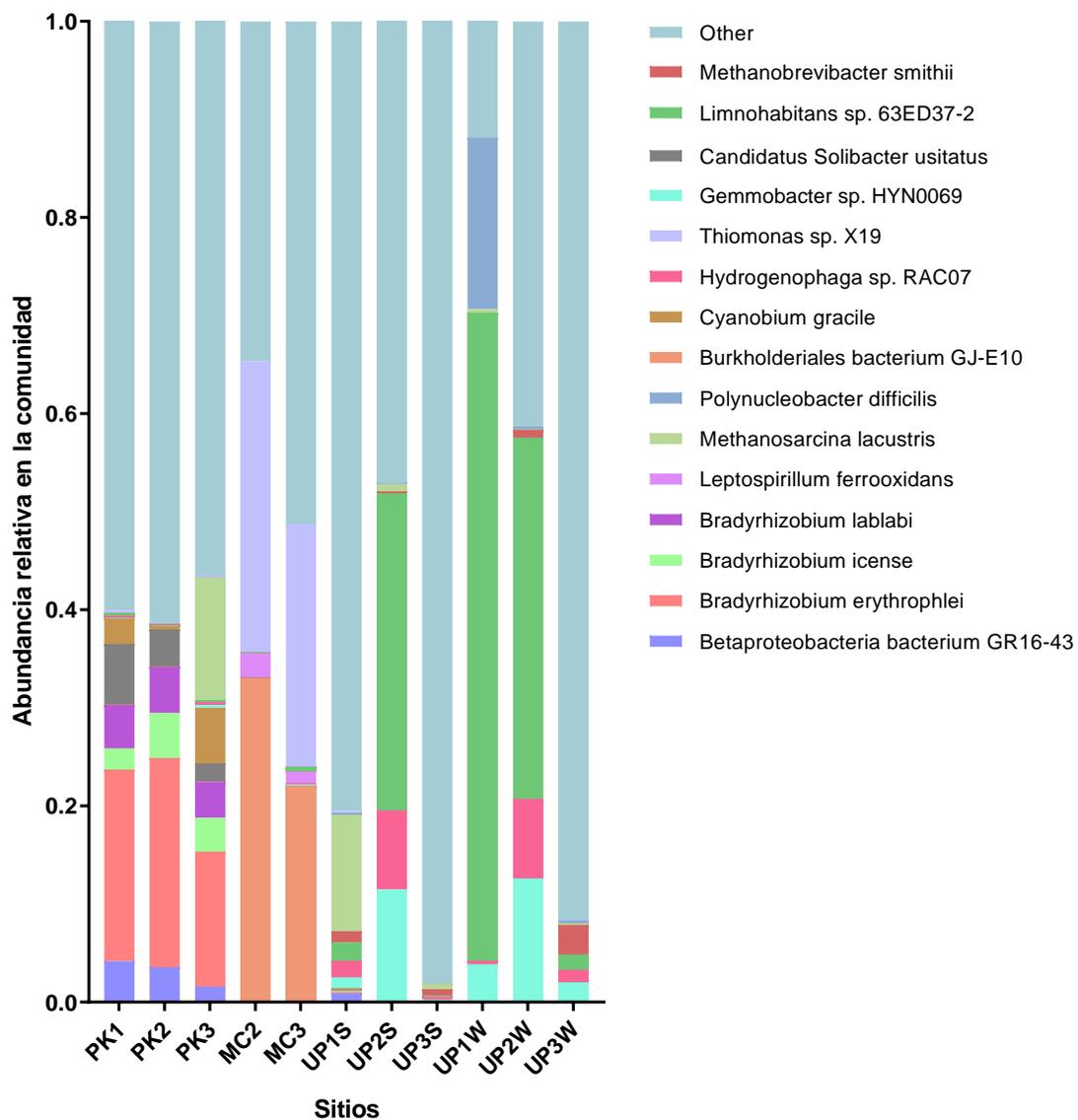
ANEXO 2.

Composición de las comunidades microbianas a nivel de familia. Abundancia relativa de bacterias presentes en la comunidad microbiana asignadas taxonómicamente a nivel de familia. S: sedimentos; W: Agua.



ANEXO 3.

Composición de las comunidades microbianas a nivel de especie. Abundancia relativa de bacterias presentes en la comunidad microbiana asignadas taxonómicamente a nivel de especie. S: sedimentos; W: Agua.



Anexo 4.

Relación entre composición de la comunidad microbiana con designaciones taxonómicas a nivel de familia, abundancia de genes y variables ambientales. Análisis de redes basado en correlaciones múltiples de Spearman para la visualización de los patrones de coocurrencia de los grupos taxonómicos, los genes cuantificados y las variables ambientales analizadas, solo las correlaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$) fueron incluidas en el gráfico. Las correlaciones son representadas como enlaces entre los nodos, los enlaces azules representan correlaciones positivas, mientras que los enlaces rojos representan las correlaciones negativas. Los nodos representan los grupos taxonómicos asignados a nivel de familia (azul), GRAs e intl1 (naranja), crAssphage (rojo), y las variables ambientales (verde).

