

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE ATENAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

PRESENCIA DE GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN  
LOMBRICES DE TIERRA DE SUELOS HORTÍCOLAS DE ZARCERO,  
ALAJUELA, COMO INDICADORES DE LA SALUD ECOSISTÉMICA DE LA  
ZONA

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN  
BUIATRÍA

REBECA DE JESÚS DELGADO GONZÁLEZ

ATENAS, COSTA RICA

2024

## DECLARACIÓN JURADA

Yo, Rebeca de Jesús Delgado González, portadora de la cédula de identidad número 4-0229-0559, estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN, en la carrera de Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, conocedora de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el Director de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 20 días del mes de mayo del 2024.



---

Rebeca de Jesús Delgado González

4-0229-0559

## HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría.



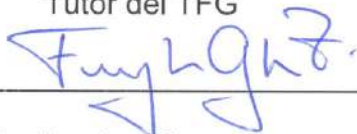
Dr. Josué Rivera Castillo

Director de Carrera



Dra. Kinndle Blanco Peña

Tutor del TFG



MSc. Freylan Mena Torres

Lector del TFG



Lic. Johnny Gabriel Brenes Bravo

Lector del TFG

## **DEDICATORIA**

A mi madre y padre, por su apoyo incondicional durante mi educación. Este es un tributo a su esfuerzo, colaboración y paciencia a lo largo de todo el camino estudiantil. También a mis abuelos, hermanos y amigos por ser pilares que fortalecieron este proceso y siempre me animaron durante el viaje académico.

## **AGRADECIMIENTO**

Con profunda gratitud quiero extender mi agradecimiento a la Dra. Kinndle Blanco Peña por aceptarme para realizar este proyecto bajo su tutela, por el conocimiento que sin dudar comparte con la comunidad universitaria y el esfuerzo puesto para que este trabajo fuera posible.

A mis lectores MSc. Freyman Mena y Lic. Gabriel Brenes, ya que sin su aporte el desarrollo del proyecto no hubiera sido tan enriquecedor; a su vez quiero destacar su disponibilidad y esfuerzo para la elaboración del presente documento.

Sin duda debo agradecer enormemente al Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET) por brindarme las facilidades para realizar este proyecto en sus instalaciones, así como a todos los integrantes del equipo (Lina, Aurora y Daniel) que de alguna manera me brindaron su ayuda y compartieron sus conocimientos mientras trabajaba en este proyecto.

Finalmente, un agradecimiento enorme a la Universidad Técnica Nacional por apoyar mi desarrollo profesional con todos los recursos posibles y a nuestro director de carrera Dr. Josué Rivera por brindar excelencia académica y asegurar la calidad profesional.

## RESUMEN

**Título:** Presencia de genes de resistencia antimicrobiana en lombrices de tierra de suelos hortícolas de Zarcero, Alajuela, como indicadores de la salud ecosistémica de la zona

**Autor:** Rebeca de Jesús Delgado González

En un contexto en el que la resistencia antimicrobiana (RAM) representa una amenaza creciente para la salud humana y la sostenibilidad de los ecosistemas, se realiza esta investigación enfocada en la evaluación de la presencia y diversidad de genes de resistencia antimicrobiana en lombrices de tierra que habitan en suelos hortícolas de la zona de Zarcero. El propósito central de esta investigación consistió en establecer la presencia de estos genes como indicadores cruciales de la salud ecosistémica.

Las lombrices de tierra son representativas de la fauna de los suelos, en especial de los agrícolas, dado que modifican los terrenos y mantienen su salud mientras se alimentan y sobreviven. Esto las convierte en excelentes bioindicadores de acuerdo con diferentes estudios ecotoxicológicos. Con esos fines, se llevó a cabo una detección de genes de resistencia a antimicrobianos mediante qPCR en 32 lombrices de tierra y en cuatro tipos de suelos de las zonas de donde provenían (finca orgánica, buenas prácticas, convencional y bosque).

De las muestras de tractos gastrointestinales de lombrices de tierra, el 37.5% expresaron un único ARG, en el que la mitad (3/16) amplificó el gen que codificaba resistencia para sulfonamidas (*sulI*) y betalactámicos (*bla<sub>TEM</sub>*). Los genes *tetA*, *tetB*, *tetQ*, *tetW*, *sulII*, *catII*, *qnrS* y *ermB* no fueron identificados.

De las cuatro muestras de suelo, la totalidad expresó genes para dos o más familias de antimicrobianos, siendo *tetW* el más común (100%), seguido de *tetQ* y *catII* (50% cada uno) y de *tetB*, *qnrS*, *sull* y *sullI* (25% cada uno). No se identificó presencia de *tetA*, *ermB* ni *blaTEM*.

**Palabras claves:** Resistencia antibiótica, ARGs, lombrices de tierra, Costa Rica, ecosistemas.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Capítulo I. Introducción .....	15
1.1 Problemática .....	16
1.2 Justificación .....	17
1.3 Antecedentes .....	18
1.4 Objetivos .....	22
1.4.1 Objetivo general .....	22
1.4.2 Objetivos específicos .....	22
1.5 Pregunta de investigación .....	22
Capítulo II. Marco Teórico .....	23
2.1 Generalidades de las lombrices de tierra .....	23
2.2 Peligros químicos emergentes (PQEs).....	23
2.2.1 Antimicrobianos como contaminantes emergentes .....	24
2.2.2 Comportamiento de los ARGs en los ecosistemas .....	24
2.3 Papel de las lombrices de tierra como indicador de la salud ecosistémica.....	25
2.4 Resistencia antimicrobiana .....	26
2.4.1 Tipos de resistencia .....	27
2.5 Técnicas moleculares.....	28
2.5.1 Extracción de ADN .....	28
2.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	29
2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) ...	30

Capítulo III. Marco Metodológico .....	31
3.1 Ubicación .....	31
3.1.1 Características de los sitios de muestreo.....	32
3.2 Muestra .....	33
3.3 Métodos .....	34
3.3.1 Extracción del ADN del material digestivo y suelos .....	34
3.3.2 Determinación de genes de resistencia a antibióticos.....	34
3.4 Determinación de rutas de exposición.....	35
3.4.1 Posibles fuentes de exposición.....	35
3.5 Análisis de datos y método estadístico.....	35
Capítulo IV. Resultados.....	37
4.1 Detección de genes de resistencia.....	37
4.2 Análisis del uso de antimicrobianos.....	43
Capítulo V. Discusión .....	44
Capítulo VI. Conclusiones .....	47
Capítulo VII. Recomendaciones .....	48
Capítulo VIII. Referencias Bibliográficas.....	50
Capítulo IX. Apéndices y Anexos .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Evolución y diseminación de organismos resistentes .....	25
<b>Figura 2.</b> Tipos de transmisión horizontal de ARGs .....	27
<b>Figura 3.</b> Tipos de extracción de ADN .....	29
<b>Figura 4.</b> Mapa de ubicación de las fincas muestreadas, nombradas según su sistema de manejo .....	31
<b>Figura 5.</b> <i>Porcentaje de muestras positivas a ARGs en lombrices y suelos según la familia antibiótica correspondiente .....</i>	40
<b>Figura 6.</b> <i>Familias antibióticas con mayor expresión de ARGs en suelos. ....</i>	41
<b>Figura 7.</b> <i>Presencia de ARGs según la familia de fármacos y la zona geográfica según la finca de donde se tomó la muestra de lombrices y suelos .....</i>	41
<b>Figura 8.</b> <i>Mapa de calor representando la carga porcentual de ARGs en muestras de contenido intestinal de lombrices y suelos hortícolas (buenas prácticas [LI2, LI3, LI4, S4, LI6, LI18 y SM], finca orgánica [LI21, LI23, S25, LI29 y SH], bosque [LI34, LI35, LI38, LI39 y SB] y convencional [LI 40, LI53 y SL]) de Zarcero .....</i>	42

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> <i>Expresión de ARGs en muestras de contenido intestinal de lombrices según zona de muestreo (finca orgánica y finca buenas prácticas) en temporada seca (S) y lluviosa (LI), Zarcero, Costa Rica.</i> .....	38
<b>Tabla 2.</b> <i>Resultados de expresión de ARGs en muestras de suelos hortícolas (bosque, finca orgánica, con buenas prácticas y convencional) en Zarcero, Costa Rica.</i> .....	39

## ÍNDICE DE APÉNDICES

<b>Apéndice 1.</b> Encuesta para determinar posibles rutas de exposición .....	60
<b>Apéndice 2.</b> Cebadores empleados durante la realización del qPCR .....	61
<b>Apéndice 3.</b> Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo orgánico .....	62
<b>Apéndice 4.</b> Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo convencional.....	63
<b>Apéndice 5.</b> Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo con buenas prácticas agropecua .....	64
<b>Apéndice 6.</b> Caracterización de las fincas de donde provienen las muestras con ARGs expresados, según su tipo de manejo .....	65

**ÍNDICE DE ANEXOS**

**Anexo 1.** Permiso de CONAGEBIO .....62

## ABREVIATURAS

**RAM:** Resistencia antimicrobiana.

**ARGs:** Genes de resistencia a antibióticos.

**MDR:** Multirresistente.

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**spp:** Especie.

**PQEs:** Peligros químicos emergentes.

**AB:** Antibiótico(s).

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

**IRET:** Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas.

**CT:** Umbral de ciclo.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha generado una creciente problemática sanitaria con respecto a la presentación de resistencia antimicrobiana (RAM) a diferentes fármacos empleados en medicina humana y veterinaria, entre los que se incluyen los antibióticos (AB). De hecho, se les ha calificado como “contaminantes emergentes” (Martínez et al., 2020).

Actualmente, se conoce que el uso desmedido de estos compuestos ha causado una acumulación en el medio ambiente, que actúa como reservorio, lo que podría generar la presencia de genes de resistencia a dichos fármacos (ARGs) y su eventual propagación (Samreen et al., 2021). Su uso irracional y un incorrecto desecho de sus residuos ha propiciado el incremento exponencial de ARGs, hasta llegar al punto de encontrar bacterias multirresistentes (Camacho et al., 2021). Es posible, señalar que dentro de las actividades humanas que más favorecen la diseminación de antibióticos al ecosistema, se encuentran la medicina humana, el sector médico veterinario y el agrícola (Mcewen et al., 2018).

En el hábitat terrestre, las lombrices son indispensables para la regulación de la estructura de los suelos. Estos organismos, mediante la degradación de la materia orgánica, logran dar estabilidad mientras adquieren nutrientes a partir de bacterias y hongos en este compartimiento ambiental (Grdiša et al., 2013). Por estas características, son consideradas bioindicadores de la salud ecosistémica (Blouin et al., 2013).

Debido a la relevancia de estos organismos, la presencia de ARGs en muestras de ADN extraídas del tracto digestivo de lombrices de tierra en suelos agrícolas se puede utilizar como indicador del impacto de los antimicrobianos sobre la salud de dichos ecosistemas (Grdiša et al., 2013).

## 1.1 Problemática

Entre los obstáculos más grandes de las ramas médicas en la actualidad está la resistencia antimicrobiana, que se caracteriza según los diferentes mecanismos empleados por los organismos como factores de evasión, con el fin de no ser afectados por fármacos destinados para su eliminación (Kumar et al., 2022).

En ese sentido, se cuenta con gran cantidad de estudios que señalan la relación directa entre el uso descontrolado de antibióticos (humano, veterinario y agrícola) y el aumento en la incidencia de resistencia antimicrobianos (RAM) (Septimus, 2018).

En estos puntos críticos de contaminación ecosistémica y propagación de ARGs se hallan los residuos hospitalarios, aguas residenciales y plantas de tratamiento, así como los desechos de la industria agrícola y ganadera (Samreen et al., 2021). Lamentablemente, la información del uso de estos fármacos en Costa Rica es poca. Sin embargo, se conoce del uso irracional en sectores agropecuarios que facilitan ambientes idóneos para la diseminación y traspaso de dichos genes (Lazo et al., 2021).

En el 2019 se estimó, de conformidad con estudios de registros individuales, que unos 4,95 millones de muertes en humanos estaban relacionadas con la resistencia antimicrobiana y una cifra alarmante de 1,27 millones de personas murió directamente a causa de bacterias resistentes a fármacos antimicrobianos (Stanley et al., 2022). Dicha problemática se ha vuelto difícil de combatir en vista de que, tanto los antibióticos como los organismos portadores de ARGs, se introducen en suelos, agua y sedimentos, de forma posterior a su uso en diferentes actividades humanas (Samreen et al., 2021).

## 1.2 Justificación

La creciente problemática de la resistencia antimicrobiana y el fallo en la efectividad de fármacos de primera línea para el tratamiento de enfermedades infecciosas ha impulsado una serie de estrategias globales guiadas por organismos internacionales para la disminución del impacto que genera (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016). El paso más importante para la mitigación es el proceso de distinción de zonas de alto riesgo, que funcionan como reservorios o diseminadores de ARGs (Samreen et al., 2021).

Es así como Costa Rica requiere un mayor número de estudios que permitan la identificación de las áreas con alta incidencia de RAM, para establecer una correlación de estos datos con las actividades humanas aledañas que propicien dicha incidencia. Al respecto, el presente trabajo pretende proporcionar información valiosa sobre el impacto de los antimicrobianos y la contaminación del suelo en la salud ecosistémica en un contexto de One Health, con la finalidad de implementar las acciones correctivas dictadas por la OMS (OMS, 2016).

Por su parte, afirman Mcewen et al. (2018), que se requiere “mejorar la investigación, así como el monitoreo ambiental y la evaluación de riesgos para comprender mejor el papel del medio ambiente en la selección y propagación de la resistencia a los antimicrobianos” (p. 13). Este monitoreo es posible si diversos organismos trabajan en conjunto, como se plantea realizar en este proyecto, por medio del cual distintas producciones agrícolas facilitan el muestreo con el fin de determinar si existen prácticas que generen altos puntos de incidencia, ayudando a identificar posibles fuentes de contaminación y proponer estrategias para reducir el riesgo.

Para el 2050, la tasa de mortalidad por infección de bacterias resistentes será de 10 millones al año, de modo que se debe iniciar con los esfuerzos por disminuir estos focos reservorios lo antes posible, para asegurar la salud pública (Samreen et al., 2021). Por lo tanto, es prudente la ejecución de estudios de salud ecosistémica que determinen la existencia de ARGs, con el propósito de correlacionar dicha presencia con las actividades ahí realizadas, como factores agravantes e implementar las acciones correctivas pertinentes, ayudando a evaluar el riesgo de propagación de ARGs.

Considerando lo anterior, es que se planteó este estudio de caso, analizando la presencia de ARGs en organismos bioindicadores de la salud ecosistémica. En ese sentido, se analizaron los contenidos intestinales de lombrices de tierra y de los suelos en los que se encontraban, pertenecientes a una zona hortícola del país. En esta área, convergen actividades agrícolas con diferente grado de uso de agroquímicos (fincas orgánicas, con buenas prácticas y convencionales), así como zonas boscosas.

### **1.3 Antecedentes**

En un estudio realizado en China por Peng et al. (2021), se estableció la presencia de ARGs por medio de PCR en heces y suelos de una granja porcina. Se mostró una tasa de detección de hasta de un 50% en todos los genes muestreados y su incidencia en heces y suelo no evidenciaron grandes diferencias. Además, se encontró resistencia a 22 compuestos activos, donde los ARGs para amoxicilina, colistina y tetraciclinas se expresaron en casi 100% de las muestras y la tasa más baja (10%) se indicó para cefalosporinas.

Por su parte, Castellanos et al. (2020), determinaron la convergencia evolutiva entre cepas de *Salmonella enterica* en Europa y América Latina, siendo que las

mismas han logrado adquirir ARGs de maneras similares, sin importar esta diferencia evolutiva. Los principales antibacterianos implicados fueron las quinolonas y los betalactámicos.

En el plano nacional, en 2019 un estudio realizado en el Gran Área Metropolitana se detectó la presencia de *Salmonella* spp. resistente a antibióticos de uso médico en mapaches residentes de áreas periurbanas. Se halló una resistencia a ciprofloxacina de un 9,5% y un 7,1% de resistencia al ácido nalidíxico, identificando a estos animales como reservorios de RAM en áreas colindantes a poblaciones humanas (Baldi et al., 2019).

A su vez, Rojas et al. (2019), buscaron evidenciar la resistencia antimicrobiana en muestras de *E. coli* obtenidas de dantas. De las 60 muestras, solo una mostró resistencia al ácido nalidíxico y se atribuyó la baja incidencia al área muestreada, ya que en esta colindan hasta siete áreas protegidas del país. Un factor importante que no fue tomado en cuenta para explicar la razón en la baja cantidad de muestras positivas, respondió al hecho de que las pruebas fueron realizadas con extracciones de ADN a partir de cultivos bacteriano (Jiang et al., 2013). De esa forma, se conoce que solo 1-3% de las bacterias son cultivables, por lo que pudieron presentar falsos negativos (Torsvik & Øvreås, 2002).

También Lazo et al. (2021) determinaron perfiles antimicrobianos en cepas de *Campylobacter* spp. pertenecientes a pollos de engorde, demostrando una resistencia considerable a las quinolonas (64,9%), tetraciclinas como la doxiciclina con un 24,3%. En menor cantidad se presentó resistencia a la eritromicina. No se reportaron bacterias multirresistentes en los seis antibióticos probados.

Por su lado, Fernandes et al. (2022), llevaron a cabo un muestreo en perezosos de dos y tres dedos para identificar bacterias resistentes a antibióticos, logrando detectar hasta un 17,5% de aislamientos multirresistentes. El estudio evidenció una mayor incidencia de la resistencia antibiótica en los animales con mayor contacto

humano que los que eran liberados sin tanto contacto, mencionando como amenaza la exposición entre humanos y animales silvestres.

Los autores Marín et al. (2022), comprobaron que las penicilinas son los antibióticos mayormente usados en Costa Rica, con un 25,95%; seguido por las cefalosporinas y los carbapenémicos, que presentaron un 16,61% de resistencia. Las tetraciclinas se posicionaron en tercer lugar, con un 14,78% de incidencia y las sulfonamidas se ubicaron en el último puesto, con un 14,77%.

Se encontraron investigaciones que ponen de manifiesto el impacto de las actividades pecuarias en el área de la resistencia antimicrobiana, desde el punto de vista de la conservación. Tal como lo reseñado por Angulo et al. (2023), quienes se analizaron muestras de heces de jaguares y pumas de áreas protegidas para la identificación de 16 ARGs. En este estudio, se efectuó la extracción del ADN directamente de la muestra, sin llevar a cabo cultivo. En general, las tetraciclinas, sulfonamidas, fenicoles y quinolonas presentaron resistencia considerable, pero no así en el caso de la vancomicina ni de la meticilina.

Asimismo, Rojas et al. (2023), buscaron estimar la prevalencia de resistencia antimicrobiana en aislados de *Salmonella entérica* en primates de centros de rescate. Se muestrearon tres categorías (heces, alimento y ambiente), identificando gran resistencia a ciprofloxacina y nitrofurantoína en todas las matrices. No se establecieron organismos multirresistentes.

Un estudio realizado en parques nacionales en el país en 2023, arrojó datos preocupantes, debido a que se detectaron ARGs en heces de felinos silvestres para fármacos como: tetraciclinas, sulfonamidas, fenicoles y quinolonas y los mismos eran considerablemente altos. Dicho trabajo supuso el impacto de las diferentes

actividades antropogénicas alrededor de estas áreas naturales como diseminadores de resistencia antimicrobiana a especies totalmente silvestres (Blanco et al., 2024).

## **1.4 Objetivos**

### *1.4.1 Objetivo general*

Determinar la presencia de indicadores moleculares de genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en lombrices de tierra de suelos hortícolas de Zarcero (Alajuela), mediante la cuantificación por qPCR, para su uso como referente de la salud ecosistémica durante el periodo 2023.

### *1.4.2 Objetivos específicos*

Detectar la presencia de genes de resistencia a antimicrobianos en muestras de contenido intestinal de lombrices de tierra mediante qPCR, para la identificación de los grupos de antibióticos resistentes.

Determinar la frecuencia de la presencia de los genes de resistencia a antibióticos mediante estadística descriptiva, para la elaboración de un mapa de calor en el cantón de Zarcero.

Relacionar el tipo de manejo de la finca (producción orgánica, convencional, buenas prácticas agrícolas y bosque) con los resultados laboratoriales obtenidos mediante la comparación cualitativa, para la determinación de los factores influyentes en la salud ecosistémica.

## **1.5 Pregunta de investigación**

¿Se detectan genes de resistencia antimicrobiana en el contenido intestinal de lombrices de tierra en suelos utilizados para la horticultura en la zona de Zarcero?

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades de las lombrices de tierra

Las lombrices de tierra son oligoquetos pertenecientes al orden *Crassiclitellata*, que se conforman de múltiples capas celulares. Algunas especies de estos organismos pueden llegar a medir hasta 1 m de largo y 3 cm de grosor; además, poseen hábitos terrestres principalmente en zonas húmedas (Fragoso et al., 2014 y Schmelz et al., 2021). El género *Amyntas* es uno de los cuatro que componen la familia Megascolecidae, la cual incluye lombrices de tierra que tienen ciegos intestinales (Fahri et al., 2018). Este género es nativo de Asia, muy diverso y se puede encontrar comúnmente en áreas de hojarasca o suelos boscosos (Kim & Hong, 2022).

Los organismos citados son capaces de mejorar la disponibilidad de nutrientes y regenerar la estructura de los suelos, dado que ejercen un cambio en sus características físicas, químicas y biológicas por medio del reciclaje del material orgánico (Andleeb et al., 2021; Shi et al., 2017).

Gracias a lo anterior y a que las lombrices de tierras regulan el agua y disminuyen la contaminación en los suelos, se les conocen como las “ingenieras” del suelo. Por ese motivo, es evidente su aptitud para ser de gran ayuda en la gestión de la salud ecosistémica (Blouin et al., 2013).

### 2.2 Peligros químicos emergentes (PQEs)

Los PQEs son sustancias que, debido al aumento reciente de su uso, están recibiendo mayor atención como contaminantes por la concentración y distribución que logran en la naturaleza. No obstante, han demostrado ser perjudiciales, tanto para los ecosistemas como para la salud humana y animal, por la falta de regulación

en su uso. Por ende, se conocen también como contaminantes emergentes (Martínez et al., 2020).

De manera general, dichos compuestos llegan al medio ambiente por aguas residuales, actividades agropecuarias y descargas de plantas de tratamiento. El agua es el principal diseminante, ya que los procesos de tratamiento de aguas residuales no degradan este tipo de contaminantes, de forma que siguen disueltos en los efluentes. Así mismo, algunos de ellos vuelven al humano a través de las cadenas tróficas mediante la bioacumulación (Pachés, 2020).

### *2.2.1 Antimicrobianos como contaminantes emergentes*

Sumado al papel esperable de los antibacterianos como contaminantes emergentes al crear ambientes idóneos para que organismos se expongan y generen resistencia antimicrobiana (Barrantes et al., 2022), otra problemática relevante generada a partir de su presencia en el ecosistema, es la acumulación de ARGs en compartimentos ambientales importantes, como mantos acuíferos y suelos (Martínez et al., 2020).

Se ha evidenciado en los últimos años, que los ARGs y las bacterias que los portan, pueden ser depositados en suelos y mantos acuíferos, funcionando como reservorios y aumentando las posibilidades de propagación (Chika et al., 2019). En consecuencia y por el tiempo que ha tomado evidenciar los antibióticos como PQEs, su control se vuelve una tarea muy complicada, necesitándose de un trabajo interdisciplinario intenso entre las ciencias médicas, ambientales, industria y agricultura (Barrantes et al., 2022).

### *2.2.2 Comportamiento de los ARGs en los ecosistemas*

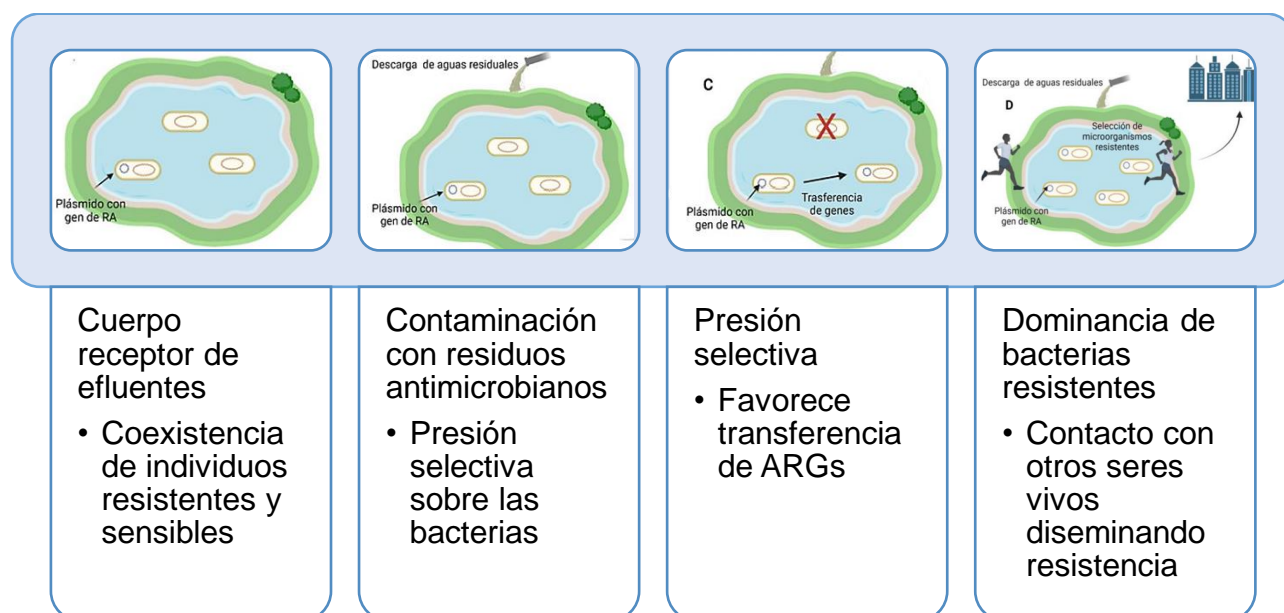
El hallazgo de ARGs en diferentes ecosistemas se atribuye, en su mayoría, a la actividad humana dentro de estos nichos, lo que aumenta la prevalencia de

fármacos. Esto favorece la adquisición de ARGs y la diseminación de bacterias ya resistentes, que pueden transferir estos genes a otros individuos (Barrantes et al., 2022).

Los individuos no son capaces de metabolizar los compuestos en su totalidad, por lo que son excretados vía renal o fecal, posterior a su administración como tratamiento en la medicina humana o veterinaria (Martínez et al., 2020). Señalan Barrantes et al. (2022), que existen áreas conocidas como “hot spots” dado que: “hay un incremento en la tasa de transferencia horizontal de genes (Figura 1), lo cual confiere más diversidad al genoma de las comunidades microbianas” (p. 6).

### Figura 1.

#### *Evolución y diseminación de organismos resistentes*



Adaptado de Barrantes et al. (2022).

### 2.3 Papel de las lombrices de tierra como indicador de la salud ecosistémica

Los enfoques tradicionales de valoración de la contaminación del suelo con sustancias específicas se centran en las mediciones directas al suelo, lo que limita la

evaluación del efecto negativo de dicho contaminante sobre los organismos que habitan ese ecosistema (Shi et al., 2017).

Con base en sus características biológicas y comportamentales, las lombrices de tierra son bastante estudiadas por su potencial como bioindicadores de la salud del suelo, tanto así que son consideradas por organismos internacionales como “especies modelo” para su evaluación ecotoxicológica (Shi et al., 2017).

De acuerdo con Montiel (2020) la ecotoxicidad es “la ciencia que estudia la contaminación, su origen y los efectos que esta puede causar en el ecosistema y los seres vivos” (p. 15). Esta es una rama de la toxicología que se encuentra en auge por la creciente preocupación por contaminantes ambientales que ya evidencian un daño permanente en los ecosistemas mundiales. En ese orden de ideas, el uso de oligoquetos como bioindicadores de la salud de los suelos puede ayudar a identificar áreas contaminadas de manera temprana y a diagnosticar sitios con alta degradación de los suelos (Shi et al., 2017).

#### **2.4 Resistencia antimicrobiana**

Se conoce como resistencia antimicrobiana (RAM) a los cambios evolutivos que generan las bacterias para no verse afectadas por los fármacos antibacterianos de uso terapéutico (Barrantes et al., 2022). El desarrollo de la RAM se ha visto potenciado por el uso desmedido de estos productos en la clínica humana, animales de producción y agricultura, exponiendo a diferentes ecosistemas a sus efectos (Torrades, 2021).

Al respecto, cabe indicar que ese fenómeno no es más que una demostración de la adaptabilidad de los seres vivos con el fin de sobrevivir y evolucionar, porque las bacterias han hallado variaciones genéticas que les permite desarrollarse casi a la misma velocidad que la creación de nuevas terapias antimicrobianas (Torrades,

2021). Lo anterior explica por qué la RAM es una amenaza mundial, dado su impacto en la salud pública, ya que genera la ineficiencia de las terapias antibióticas en la práctica médica diaria (Barrantes et al., 2022).

#### 2.4.1 Tipos de resistencia

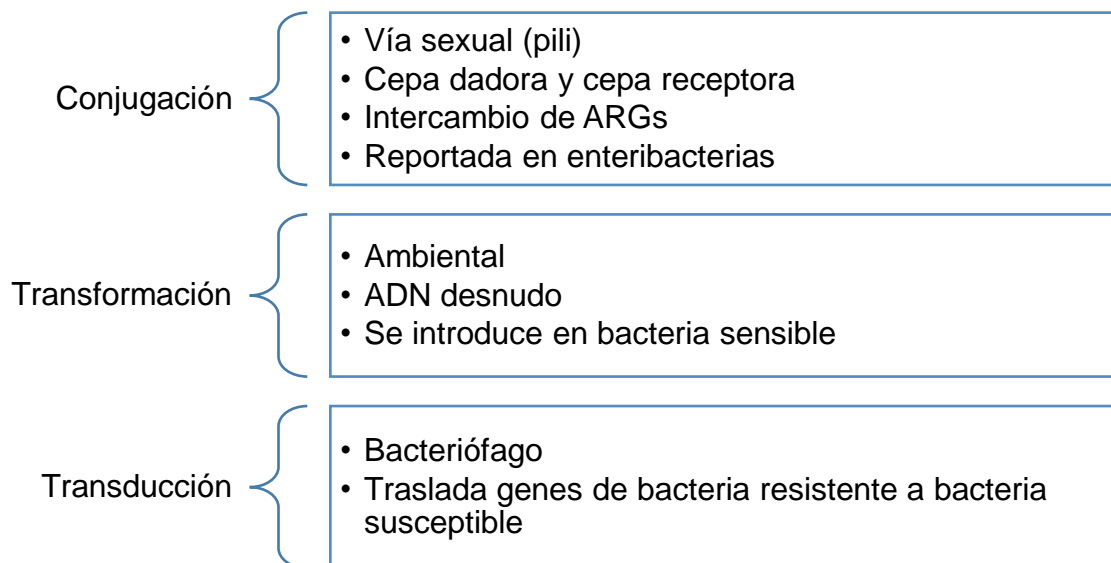
La manera en que las bacterias obtienen resistencia antimicrobiana puede clasificarse en dos mecanismos principalmente, según Torrades (2021):

- Mutaciones del genoma propio (transmisión vertical).
- Adquisición de genes facilitados por otras bacterias (transmisión horizontal).

Desde el punto de vista científico, la transmisión horizontal es la que más genera inquietud, en vista de que bacterias de distinto género y especie pueden transferirse ARGs a través de porciones de ADN denominadas plásmidos (Torrades, 2021). Dicha transmisión se puede dar mediante tres procesos, detallados en la Figura 2.

#### Figura 2.

##### *Tipos de transmisión horizontal de ARGs*



Fuente: Torrades (2021).

Los citados mecanismos de distribución de genes de resistencia son facilitados por la convivencia con bacterias resistentes, que actúan como donadores hacia bacterias sensibles, que funcionan como receptoras. Estas suelen ser microorganismos ambientales que no se encuentran en tanto contacto con dichos fármacos (Barrantes et al., 2022).

Otro factor que aumenta la incidencia es la administración de antibióticos de manera desmedida y continua, provocando la muerte de organismos sensibles y la colonización de individuos resistentes (Torrades, 2021).

## **2.5 Técnicas moleculares**

Las pruebas desarrolladas a partir de la biología molecular han logrado detectar microorganismos, genotipos de una especie y genes específicos mediante el análisis del ácido nucleico de una muestra (Merchán et al., 2018). Previo a la realización de cualquier técnica molecular, es necesaria una extracción del ácido nucleico, ya sea de ADN o ARN, así como su purificación para asegurar la sensibilidad y especificidad de la prueba molecular (Mellado, 2020).

### *2.5.1 Extracción de ADN*

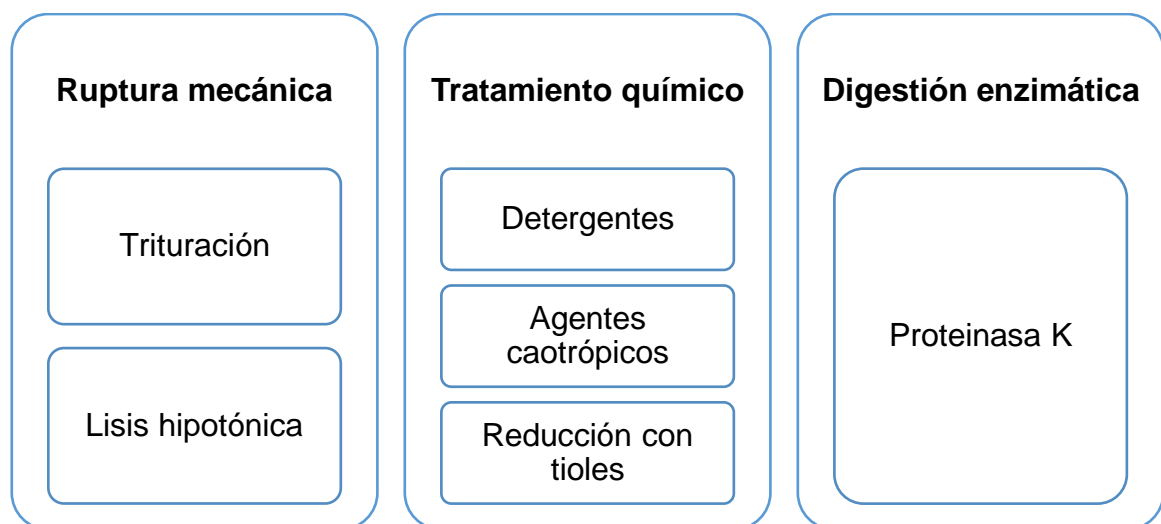
Esta técnica procura obtener una muestra de ADN lo más limpia posible para así asegurar su integridad, de manera que se obtenga un producto sin contaminantes para la realización de pruebas moleculares que utilizan la secuenciación genética como base técnica (Cruz et al., 2021).

Añade Mellado (2020), que “la extracción del ADN es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular” (p. 89). Por esa razón, se han desarrollado protocolos específicos a través del empleo de kits comerciales que facilitan este paso del proceso y lo automatizan (Cruz et al., 2021).

Los protocolos de extracción normalmente constan de tres pasos: 1) lisis celular, 2) inactivación de enzimas nucleasas (ADNasas y ARNasas) y 3) segregación de los ácidos nucleicos (Cruz et al., 2021 y Mellado, 2020). Se conocen tres tipos de extracción de ADN, los cuales se basan en la ruptura mecánica, en el tratamiento químico o en la digestión enzimática (Figura 3).

### Figura 3.

*Tipos de extracción de ADN*



Fuente: Mellado (2020).

#### 2.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica molecular fue desarrollada por el doctor Kary Mullis en 1983 (Zhu et al., 2020) y consiste en replicar el ADN en grandes cantidades a partir de una muestra que funciona como plantilla (Chika et al., 2019). Para ello, se requieren cuatro elementos básicos (Pérez, 2020):

- El ADN molde o plantilla: es el fragmento que se quiere replicar.
- Cebadores o primers: fragmentos de ADN de cadena sencilla a los extremos de la cadena molde que permiten el inicio de la reacción.
- Nucleótidos libres.

- Enzima polimerasa: complementa la cadena molde incorporando nucleótidos contrarios.

El ADN amplificado mediante esta técnica se puede observar mediante procesos de separación del ADN convencionales, como extracción orgánica o extracción de fase sólida (Pérez, 2020).

### *2.5.3 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)*

Esta es una modificación de la técnica del PCR convencional, conocida también como PCR cuantitativa, dado que permite, no solo ampliar el fragmento, sino también cuantificar este ADN diana en la platilla. La proporción existente se va a evidenciar cómo fluorescencia según la cantidad que esté presente en la muestra (Chika et al., 2019). Lo descrito, se realiza mediante ciclos térmicos y su duración depende de la cantidad que se programen (Zhu et al., 2020).

## CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

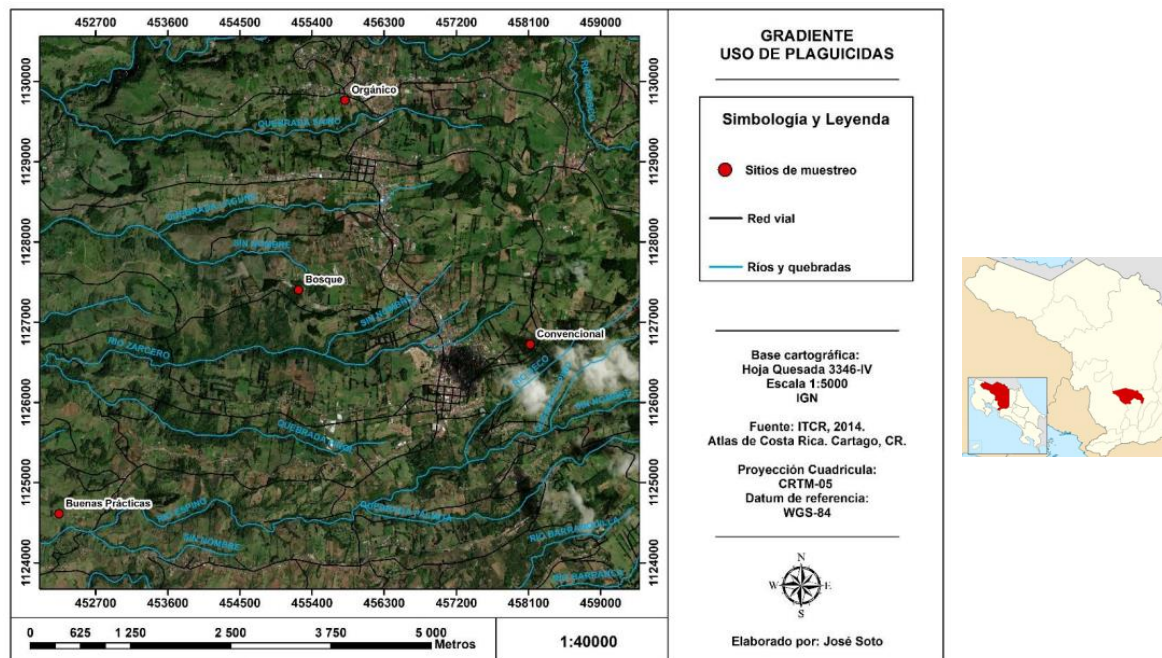
### 3.1 Ubicación

La zona geográfica de estudio se ubica en el cantón de Zarceró, provincia de Alajuela, en el occidente del Valle Central. Su extensión es de 155,13 Km<sup>2</sup> y presenta una altitud media de 1769 m s.n.m. Su clima es catalogado como tropical de montaña, caracterizado por temperaturas que rondan los 19°C, fuertes vientos y neblina durante el año (INEC, 2020).

El área ha sido incluida en diferentes proyectos de entidades gubernamentales, con el fin de promover el desarrollo económico del cantón. Por eso, el sector agropecuario está muy distribuido, en especial la horticultura, que es su principal actividad agrícola. La zona de muestreo incluye cuatro tipos de uso de suelos, que son: bosque, finca de producción orgánica, finca de producción convencional y finca con buenas prácticas agrícolas (Figura 4).

#### **Figura 4.**

*Mapa de ubicación de las fincas muestreadas, nombradas según su sistema de manejo.*



Fuente: Brenes (2022).

### 3.1.1 Características de los sitios de muestreo

La finca orgánica implementa un sistema de control de plagas combinando trampas, microorganismos efectivos y pesticidas orgánicos. Además, utiliza una variedad de abonos orgánicos como biocompost, lombricompost y biofermentos para optimizar la fertilidad del suelo. A pesar de su proximidad a los asentamientos urbanos y áreas de producción mixta, la finca no está cercana a centros de salud. En cuanto al suministro de agua, se abastece de fuentes naturales, utilizando, tanto agua de nacientes, como de ríos para el riego de los cultivos.

La finca de buenas prácticas emplea métodos de control de plagas basados en trampas y microorganismos efectivos, prescindiendo por completo del uso de pesticidas. Se destaca el uso de abonos orgánicos como biocompostaje y biofermentos. Aunque rodeada principalmente por granjas de producción pecuaria, en su entorno no hay asentamientos urbanos ni centros de salud. Al mismo tiempo, aprovecha un río y una naciente para el riego de los cultivos.

En contraste, la finca convencional, situada entre producciones mixtas y asentamientos urbanos con un centro de salud cercano, emplea una variedad de plaguicidas que incluyen insecticidas, fungicidas, herbicidas y pesticidas, junto con abonos químicos y orgánicos como la gallinaza, cabraza, caballaza y lombricompostaje. El suministro de agua proviene de manantiales naturales, así como del río local.

El área de bosque empleada para el muestreo se encuentra en una zona urbana y en ella existen nacientes de agua y un río que atraviesan la propiedad. Dado que es un área sin explotar productivamente, no se conoce el uso de pesticidas, abonos u otras prácticas de manejo agropecuario.

### **3.2 Muestra**

Se tomaron 10 individuos de la especie *Amyntas gracilis* de cada sitio de muestreo, como se indica en la Figura 4 (5 en temporada lluviosa y 5 en temporada seca). Estos organismos fueron disectados en campo y su contenido intestinal fue guardado en microtubos de 1.5 mL en nitrógeno líquido para su traslado al laboratorio. De los diferentes sitios de muestreo (bosque, finca de producción orgánica, finca de producción convencional y finca con buenas prácticas agrícolas) se tomaron también 500 gr de muestra de suelo (únicamente en temporada seca). Las muestras de tractos digestivo fueron guardadas a - 80°C en el laboratorio hasta su procesamiento y las de suelo fueron preservadas a -20°C.

El muestreo se efectuó en el marco de una tesis de maestría paralela a la presente investigación denominada “Evaluación de estrés fisiológico y variaciones en el microbioma de lombrices de tierra expuestas a plaguicidas en suelos hortícolas de Zarcero” (Brenes, 2022). Ambas se realizaron bajo la dirección del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET-UNA).

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Extracción del ADN del material digestivo y suelos

De los contenidos intestinales y las muestras de suelo se llevó a cabo una extracción total de ADN utilizando el kit DNeasy PowerLyzer PowerSoil (Qiagen corp), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad, integridad y concentración del ADN proveniente de las lombrices se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), lo cual brindó una mayor seguridad acerca de los resultados.

#### 3.3.2 Determinación de genes de resistencia a antibióticos

De conformidad con el permiso brindado por la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) (Anexo 1), se realizó la detección de los genes que codificaban para resistencia a tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetQ* y *tetW*), sulfonamidas (*sulI* y *sulII*), cloranfenicoles (*catII*), macrólidos (*ermB*), quinolonas (*qnrS*) y betalactámicos (*bla<sub>TEM</sub>*).

Para lograr la detección y cuantificación de los ARGs deseados, se hizo una qPCR, empleando el termociclador CFX96 Touch de Bio-Rad. En la reacción, se utilizó la mezcla maestra para PCR SYBR™ Green de la casa comercial Thermo Fisher®. El proceso se realizó de acuerdo con lo indicado en la guía de pasos establecida por el Laboratorio de Ecotoxicología del IRET.

Luego, se amplificó el gen 16S rRNA en cada muestra, con el propósito de detectar la presencia bacteriana que permitiera el siguiente análisis de los ARGs. Una muestra era considerada como válida cuando presentaba un umbral de ciclo (CT) por debajo de 25, según lo establecido por Doi & Arakawa (2007).

Posteriormente, se procedió con la detección de 10 ARGs en las muestras válidas. Estos 10 genes son representantes de seis familias antibióticas y los

primeros empleados se describen en el Apéndice 2. A su vez, se tomaron como muestras válidas las que presentaban un CT menor a 32.

El número de copias de los ARGs detectados se aproximó mediante la siguiente fórmula:

$$\log_{10} (\text{porcentaje de ARG}) = 2 + 0,33 * (\text{ct16SrRNA} - \text{ctARG})$$

En ella, los resultados se presentaban en un porcentaje hipotético denominado  $\log_{10}$ , 0,33 era la pendiente media para todos los genes, el ct16S rRNA correspondió al umbral de ciclo de cada muestra y el ctARG fue el umbral del ciclo para cada gen. El resultado determinó la carga porcentual de cada ARG. El valor mínimo detectable para las muestras fue  $10^{-7}$ .

### **3.4 Determinación de rutas de exposición**

#### *3.4.1 Posibles fuentes de exposición*

Con el objetivo de identificar los posibles medios de propagación de ARGs y las causas potenciales de su presencia, se efectuaron visitas a las fincas muestreadas. Se identificaron, a partir de una encuesta (Apéndice 1), las prácticas de manejo implementadas, considerando factores como tipo de abono, uso de plaguicidas, formulaciones que contenían antimicrobianos, tipos de riego y características geográficas de cada área. Para la encuesta, se tomó como base la implementada en otras investigaciones del IRET.

### **3.5 Análisis de datos y método estadístico**

Los resultados alcanzados fueron tabulados en una hoja del programa Microsoft Office Excel (Versión 2019), incluyendo, datos como la finca de procedencia, genes encontrados, familias de fármacos presentes y características recopiladas en la encuesta aplicada (Ver Apéndice 1).

Los datos se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva, utilizando el programa Microsoft Office Excel (Versión 2019). Además, se realizaron tablas de distribución de frecuencias para todas las variables categóricas y se generó un mapa de calor por medio de la herramienta RStudio versión 4.3.0 con el paquete ggplot2 (Wickham, 2016). Los valores obtenidos se expresaron en una escala de 5 a 1, facilitando la representación de los valores máximos y mínimos, lo que contribuyó a su visualización.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Se debe resaltar que posterior al proceso de extracción, se obtuvieron 32 muestras de ADN del contenido digestivo de lombrices para el desarrollo de las pruebas planteadas en este trabajo de investigación. Estas provenían de los siguientes sitios: “Bosque” (n=7), “Orgánico” (n=8), “Convencional” (n=8) y “Buenas prácticas” (n=9) (Figura 4). Adicionalmente, se realizó la extracción de ADN de cuatro muestras de suelo.

Después de la amplificación del gen 16S, resultaron válidas 20 muestras. El 20% (4/20) procedían del tracto digestivo de lombrices muestreadas en el área etiquetada como “Bosque”, 20% (4/20) de “Orgánico”, 10% (2/20) de “Convencional” y 30% (6/20) de “Buenas prácticas”. Las cuatro restantes procedían del suelo de las cuatro áreas donde se tomaron las lombrices de tierra incluidas en esta investigación.

### 4.1 Detección de genes de resistencia

De las 20 muestras validadas para contenido intestinal de lombrices y suelos, el 50% (10/20) amplificó para al menos un ARG. En el caso del contenido intestinal de las lombrices, el 37.5% (6/16) expresaron un único ARG (Tabla 1). El 18,75% (3/16) fue positiva para *sull* y 18,75% (3/16) para *bla*<sub>TEM</sub>. No se identificaron los genes *tetA*, *tetB*, *tetQ*, *tetW*, *sulll*, *catll*, *qnrS* y *ermB*.

**Tabla 1.**

*Expresión de ARGs en muestras de contenido intestinal de lombrices según zona de muestreo (finca orgánica y finca buenas prácticas) en temporada seca (S) y lluviosa (LI), Zarcero, Costa Rica.*

<b>Muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b><i>tetA</i></b>	<b><i>tetB</i></b>	<b><i>tetQ</i></b>	<b><i>tetW</i></b>	<b><i>sull</i></b>	<b><i>sulll</i></b>	<b><i>catll</i></b>	<b><i>qnrS</i></b>	<b><i>ernB</i></b>	<b><i>bla</i><sub>TEM</sub></b>
<b>LI23</b>	Finca orgánica	n.d	n.d	n.d	n.d	-0,7522	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>LI21</b>	Finca orgánica	n.d	n.d	n.d	n.d	-0,2341	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>LI29</b>	Finca orgánica	n.d	n.d	n.d	n.d	-2,6596	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>S25</b>	Finca orgánica	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,383
<b>LI4</b>	Finca buenas prácticas	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-2,2603
<b>S4</b>	Finca buenas prácticas	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	1,5479

*Nota: n.d (no detectado).*

De las cuatro muestras de suelo, la totalidad expresó ARGs para dos o más familias de antimicrobianos, como se observa en la Tabla 2. El gen más común fue *tetW* (100%), seguido de *tetQ* y *catII* (50%), *tetB*, *qnrS*, *sull* y *sullI* (25%). No se identificó *tetA*, *ermB* ni *bla<sub>TEM</sub>*.

**Tabla 2.**

*Resultados de expresión de ARGs en muestras de suelos hortícolas (bosque, finca orgánica, con buenas prácticas y convencional) en Zarcero, Costa Rica.*

Gen	Orgánico	Bosque	Buenas prácticas	Convencional
<i>tetA</i>	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>tetB</i>	n.d	n.d	n.d	0,3368
<i>tetQ</i>	n.d	n.d	1,4357	-1,0195
<i>tetW</i>	-2,9335	-2,8576	-1,4089	-2,6629
<i>sull</i>	n.d	n.d	n.d	-1,3693
<i>sullI</i>	-2,5573	n.d	n.d	n.d
<i>catII</i>	-2,488	-2,686	n.d	n.d
<i>qnrS</i>	-3,0721	n.d	n.d	n.d
<i>ermB</i>	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	n.d	n.d	n.d	n.d

*Nota: n.d (no detectado).*

Al comparar los resultados para los contenidos intestinales de lombrices y los suelos de donde estas provenían, se encontró que el gen *tetW* estaba presente en todos los suelos analizados, pero no en las lombrices de tierra. En el caso del gen *sull*, únicamente se observó en muestras de suelo de fincas convencionales y no en las lombrices de dichas áreas.

Por otro lado, el gen *tetQ* se encontró presente en los suelos, tanto de fincas convencionales como de buenas prácticas, pero no se halló en las lombrices de ninguna de estas áreas. En cuanto al gen *bla<sub>TEM</sub>*, se identificó en lombrices de tierra

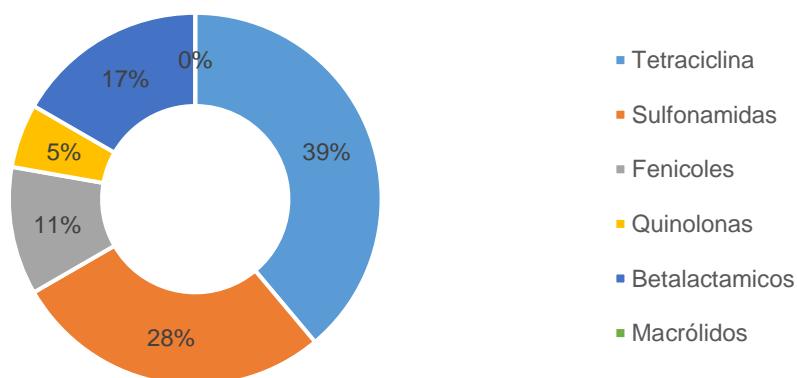
procedentes de dos fincas diferentes (una orgánica y otra de buenas prácticas), sin embargo, no se encontró en ninguna muestra de suelo. Los genes *sullI* y *catII* se detectaron en muestras de suelo orgánico, pero no estaban presentes en las lombrices de tierra de dicha zona.

El gen *qnrS* se encontró en muestras de suelo provenientes de bosques y fincas orgánicas, pero no se observó en las lombrices de tierra. Por último, el gen *tetB* se expresó en muestras de suelo de fincas convencionales, pero no se detectó en las lombrices (Ver Apéndice 6).

Con respecto a las familias de antimicrobianos para las cuales algún gen codificaba resistencia, las más frecuentemente identificadas fueron las tetraciclinas (36%), seguido de sulfonamidas (28%) y betalactámicos (17%) (Figura 5). En el caso de las lombrices, correspondieron a las sulfonamidas y los betalactámicos (50% cada uno), a pesar de que, en los suelos, fueron las tetraciclinas (100%), las sulfonamidas y los fenicoles (50% cada uno) y, por último, las quinolonas (25%) (Figura 6). Los genes que codificaban resistencia para macrólidos no fueron detectados ni en lombrices ni en suelos.

### Figura 5.

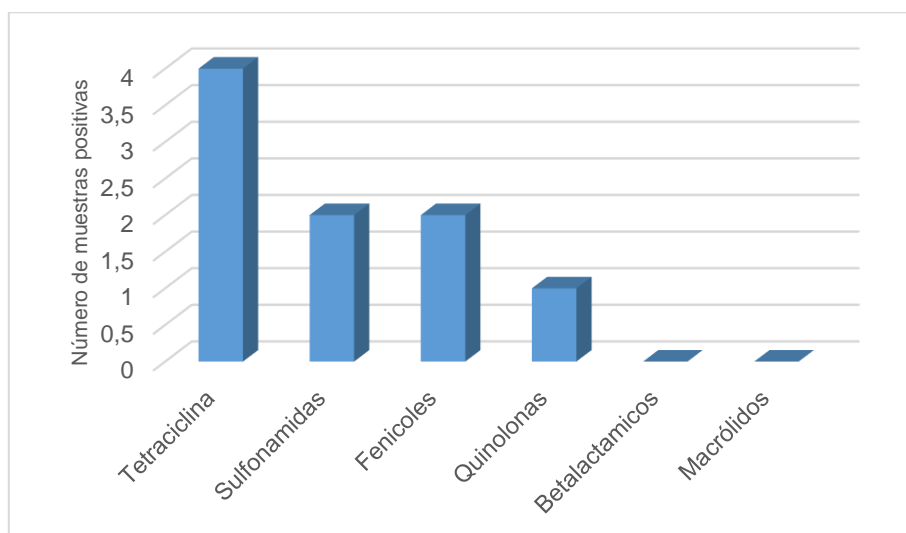
*Porcentaje de muestras positivas a ARGs en lombrices y suelos según la familia antibiótica correspondiente.*



Fuente: propia.

**Figura 6.**

*Familias antibióticas con mayor expresión de ARGs en suelos.*

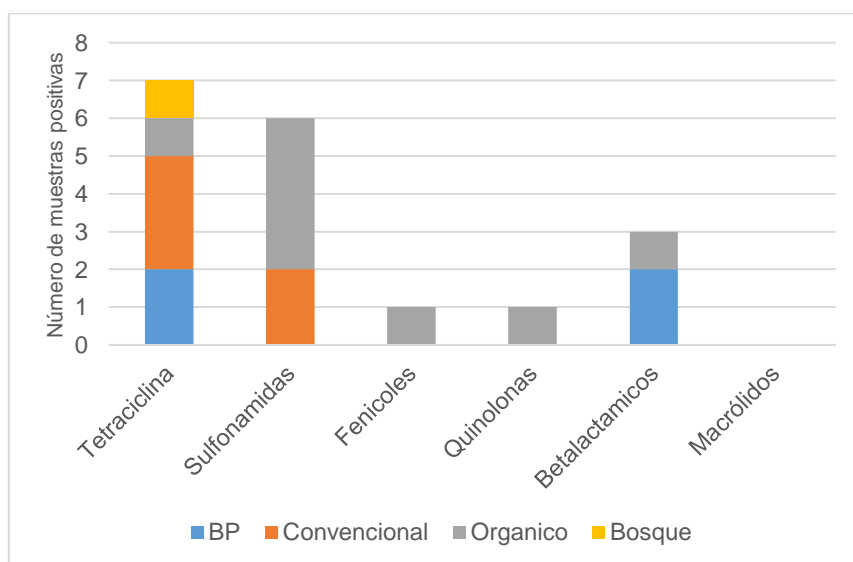


Fuente: propia.

Según la localización de las muestras (Figura 7), la finca catalogada como “orgánica” fue la que mayor presencia de ARGs tuvo. Estos codificaban resistencia para cinco de las seis familias antibióticas tomadas en cuenta en el trabajo realizado.

**Figura 7.**

*Presencia de ARGs según la familia de fármacos y la zona geográfica según la finca de donde se tomó la muestra de lombrices y suelos.*

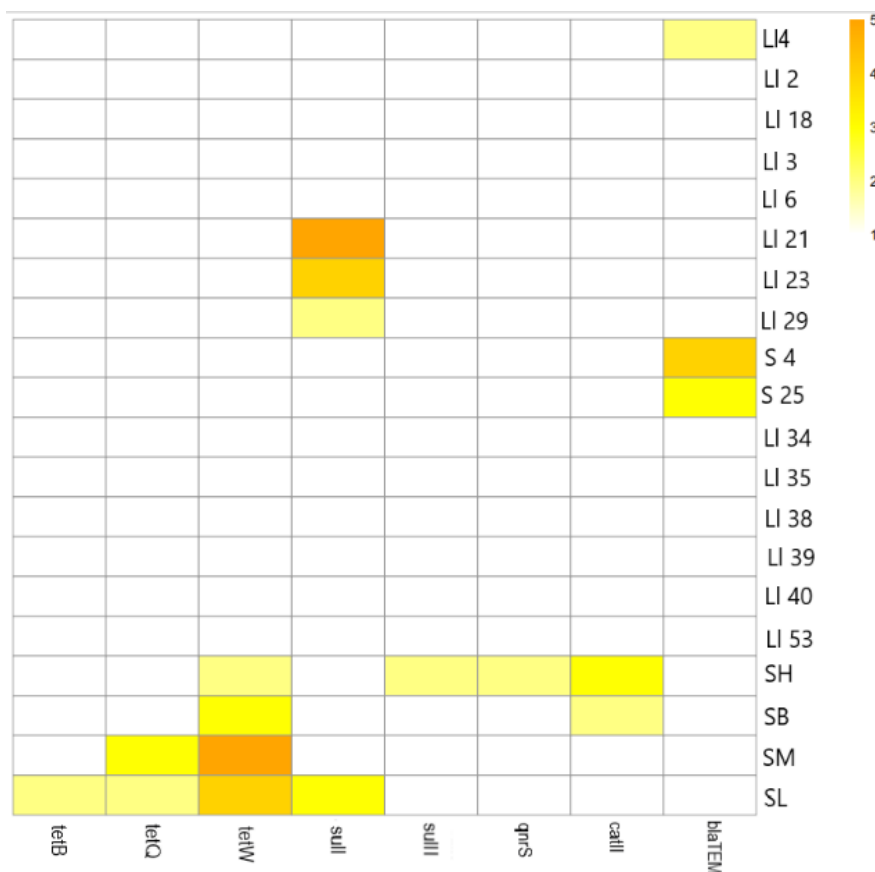


Fuente: propia.

Tomando en consideración los valores obtenidos en  $\log_{10}$ , siendo este un porcentaje hipotético de bacterias que amplificaron cada gen, se determinó la carga porcentual de ARGs en cada muestra. Esto permitió la elaboración de un mapa de calor con las concentraciones de ARG para cada muestra con una escala que determina su concentración (Figura 8). El gen *bla*<sub>TEM</sub> de la muestra S4, *sull* de la muestra LI21 y *tetQ* de la muestra SM presentaban las mayores cargas ambientales dentro de los genes encontrados en el presente estudio.

### Figura 8.

*Mapa de calor representando la carga porcentual de ARGs en muestras de contenido intestinal de lombrices y suelos hortícolas (Buenas prácticas [LI2, LI3, LI4, S4, LI6, LI18 y SM], Orgánica [LI21, LI23, S25, LI29 y SH], Bosque [LI34, LI35, LI38, LI39 y SB] y Convencional [LI 40, LI53 y SL]) de Zarcero.*



Fuente: propia.

## **4.2 Análisis del uso de antimicrobianos**

De acuerdo con las entrevistas realizadas a los productores agrícolas de las áreas de muestreo (Apéndice 3, 4 y 5), se establece que ninguno empleaba plaguicidas con antibióticos en su composición. Sin embargo, se identificó la presencia de producciones pecuarias en las cercanías, así como el uso de gallinaza, suero de leche y otros subproductos como materia prima para la elaboración de abono o su uso directo en el suelo.

Se pudo identificar que el 100% de las fincas utilizaban agua de naciente para realizar el riego y un 66,7%, agua de río (por sistema de bombeo). A su vez, un 66,7% de producciones tenía asentamientos urbanos colindantes y solamente una finca reportó centros de salud cercanos.

## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

El abordaje de este trabajo se realizó desde el análisis descriptivo de presencia/ausencia y cuantificación relativa de ARGs en el contenido intestinal de lombrices y los suelos en los que viven. Se observó la presencia de los genes *sull* y *bla<sub>TEM</sub>* en el contenido intestinal de lombrices y de *tetB*, *tetQ*, *tetW*, *sull*, *sulll*, *catII* y *qnrS* en los suelos.

Cabe mencionar, que esta investigación fue planteada como un análisis de tipo descriptivo sobre la presencia/ausencia de ARGs en lombrices de tierra, a diferencia la mayoría de los reportes en la literatura, que pretenden determinar su efecto en los ecosistemas de suelos (Zhu et al., 2020).

Aunque el número de muestras de suelo fue limitado, permitió apreciar una marcada disminución en la abundancia de ARGs al comparar los resultados de las muestras de suelo con los individuos del estudio. En todo caso, investigaciones previas sugieren que las lombrices de tierra pueden reducir hasta un 41,5% los ARGs en suelos tras el vermicompost (Kui et al., 2020; Hu et al., 2022). Esto resultó notable en la finca convencional, donde se detectaron genes que codifican para tetraciclinas en el suelo, pero no en las lombrices. Pero esta tendencia no se evidenció en las lombrices de suelos orgánicos, que presentaban genes para betalactámicos, pero que no se detectaron en las muestras de suelo correspondientes.

No obstante lo anterior, se requieren estudios adicionales para confirmar esta hipótesis y comprender por qué algunos genes están presentes en ciertas muestras y no en otras. Se sugiere, por lo tanto, realizar nuevas investigaciones que abarquen un mayor número de muestras de suelo para evaluar la carga inicial de ARGs y su reducción posterior tras el vermicompost. Esta estrategia podría ofrecer una posible

solución a la problemática de la resistencia antimicrobiana al inactivar estos genes dentro del tracto digestivo, como han sugerido estudios anteriores.

Las familias de antimicrobianos para las cuales se encontró al menos un gen que codifica resistencia correspondían a tetraciclinas (36%), sulfonamidas (28%) y betalactámicos (17%). El único gen que no se detectó en ninguna muestra fue el que codificaba resistencia a macrólidos, lo que podría deberse a su bajo uso en actividades agropecuarias de rutina como el tratamiento de mastitis, ya que estos fármacos son los que menos se emplean en su tratamiento, como lo expone Luna et al. (2006). Pero se requeriría ampliar el área de muestreo para identificar si esto ocurre en todas las fincas.

Como se comentó antes, los datos de expresión génica se expusieron en  $\log_{10}$ , donde el valor mínimo detectable era de  $10^{-7}$  (0,00000007). Si bien la amplificación de al menos un gen fue observada en una pequeña cantidad de muestras de lombrices (37,5%), el  $\log_{10}$  de algunas fue considerablemente alto. Por ejemplo, la muestra de lombriz S4, tomada de la finca con buenas prácticas, expresó un  $\log_{10}$  de 1,5479 para el *bla<sub>TEM</sub>* (Tabla 2), que representa una carga porcentual en el ambiente de un 35,3% para dicho gen (Blanco et al., 2024).

Si bien es cierto, durante la entrevista no se halló evidencia de que algún productor utilizara plaguicidas o abonos que contuvieran fármacos antibióticos, sí existen condiciones del uso del suelo que podrían afectarlas. Por citar un ejemplo, en sus cercanías existen producciones pecuarias, así como acceso a aguas de ríos, que podrían servir como fuentes importantes de diseminación de ARGs en los ecosistemas (Vargas et al., 2024).

Al mismo tiempo, la mayoría de productores afirmó emplear subproductos de explotaciones pecuarias, como gallinaza o suero de leche, que pueden servir como

fuente de fármacos y de ARGs (Samreen et al., 2021). De hecho, las producciones que mostraron expresión de genes en lombrices fueron la orgánica y buenas prácticas las cuales hacen uso de abonos orgánicos que emplean subproductos animales. Sin embargo, se debería implementar también un análisis específico para la identificación de estos contaminantes emergentes en dichas muestras.

En vista de que los ARGs expresados en ambas muestras (lombrices y suelos) son muy dispersos y no están delimitados a una sola familia de fármacos, pueden sugerir que el área presenta una contaminación con antimicrobianos que puede estar modulando la resistencia en la comunidad bacteriana. Su baja expresión en los contenidos digestivos de las lombrices podría deberse a algún factor intrínseco del individuo, como la inactivación durante el vermicompost mencionado anteriormente, y no a la ausencia de contacto con bacterias resistentes o fármacos antibióticos (Arora et al., 2021; Dong et al., 2020 y Hu et al., 2022).

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

La determinación de ARGs en el ambiente permite alcanzar conocimientos acerca de su concentración. Esto facilita la identificación de focos de dichos contaminantes emergentes, en pro de la toma de acciones y decisiones en el control y mitigación de agentes diseminadores de resistencia antimicrobiana.

Durante la investigación se logró demostrar la presencia de ARGs para cinco familias de fármacos antimicrobianos en suelos hortícolas de Zarcero, siendo las tetraciclinas encontradas en la mayor cantidad de muestras positivas. Lo anterior, podría sugerir una contaminación alta de dichos compuestos en el ambiente o la presencia de individuos portadores de ARGs que pueden servir como diseminadores.

Lo anteriormente descrito, fue ejemplificado al analizar los datos correspondientes al manejo de cada área muestreada, ya que se pudo destacar que las fincas con mayor expresión de ARGs en contenido de lombrices empleaba prácticas de abono orgánicas que implementaban subproductos de animales como gallinaza o suero de leche, que podrían contener restos antimicrobianos o individuos portadores de ARGs.

En futuras investigaciones, se deben incluir más fincas agrícolas y pecuarias, con la finalidad de dilucidar de dónde viene la contaminación con antimicrobianos.

## CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

La resistencia antimicrobiana es una realidad mundial que requiere de medidas inmediatas para disminuir su incidencia y mitigar la velocidad con que este problema se expande en los ecosistemas nacionales. Es necesaria la implementación de legislación que establezca un control en el uso de antibióticos para profesionales de la salud, explotaciones agropecuarias y en otras áreas, con el fin de eliminar el uso desmedido de estos fármacos.

Con base en lo señalado, resulta clara la necesidad de investigaciones que contribuyan a comprender mejor la actividad de los ARGs en los ecosistemas, con el propósito de que se generen datos que permitan elaborar una ruta de acción e implementar estrategias naturales que brinden una posible solución a la problemática.

En ese sentido, se espera que este proyecto sirva de catalizador para futuras investigaciones en diferentes zonas del país, ya que dicha información es importante para combatir la problemática de RAM, situación que requiere de una actuación política y gremial urgente.

Consecuente con el desarrollo de la presente investigación, se hace posible brindar ciertas recomendaciones en pro de mejorar los resultados del proyecto para colaborar en futuras investigaciones:

- Aumentar el número de sitios de muestreo y de muestras para robustecer el análisis estadístico.
- Evaluar en profundidad las rutas por las cuales los antimicrobianos o genes de resistencia llegan a los suelos.
- Analizar la presencia de antimicrobianos en los productos que se aplican durante las actividades cotidianas de las fincas.

- Examinar la dinámica de aplicación en temporada seca y lluviosa para determinar si el comportamiento de los contaminantes y su presencia varían.
- Se propone la implementación de un equipo interdisciplinario que pueda ofrecer su conocimiento en las diversas etapas de la investigación, porque esto asegura un planteamiento más global del estudio, partiendo de diferentes conocimientos sobre la temática en cuestión.

## CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminov, R., Jeanjean, N., & Mackie, R. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl Environ Microbiol*, 67(1), 22-32. doi:10.1128/AEM.67.1.22-32.2001
- Andleeb, S., Arshad, W., Ghulam, R., Islam, G., Naseer, A., Shafique, I., Abbas, S. (2021). ESIDE: A computationally intelligent method to identify earthworm species (*E. fetida*) from digital images: Application in taxonomy. *Plos One*, 16(9), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0255674
- Angulo, A., Esperón, F., Salom, R., Carazo, J., Taylor, F., Pilé, E., Blanco, K. (2023). Identification of anthropogenic impact on natural habitats by antimicrobial resistance quantification in two neotropical wild cats and their geospatial analysis. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 59(1), 12-23. doi:10.7589/JWD-D-21-00182
- Arango, S. (2015). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75-82. doi:<https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.9607>
- Arora, S., Saraswat, S., Rajpal, A., Shringi, H., Mishra, R., Sethi, J., Kazmi, A. (2021). Effect of earthworms in reduction and fate of antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistant genes (ARGs) during clinical laboratory wastewater treatment by vermifiltration. *Science of the Total Environment*, 773, 1-11. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145152
- Baldi, M., Barquero, E., Hutter, S., & Walzer, C. (2019). Salmonellosis detection and evidence of antibiotic resistance in an urban raccoon population in a highly

- populated area, Costa Rica. *Zoonoses Public Health*, 66, 952-960.  
doi:10.1111/zph.12635
- Barrantes , K., Chacón, L., & Arias , M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en*, 19(2), 1-24.  
doi:https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590
- Blanco, K., Quesada, F., Salas, D., Estrada, S., Salom, R., Arroyo, S., Chaverri, F. (2024). A multidisciplinary approach to analyze the antimicrobial resistance in natural ecosystems. *Environmental Research*, 251(1), 1-54.  
doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118549
- Blouin, M., Hodson, M., Delgado, E., Brussaard, L., Butt, K., Dai, J., Brun, J. (2013). A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*, 64(2), 161-182.  
doi:https://doi.org/10.1111/ejss.12025
- Brenes, G. (2022). Evaluación de estrés fisiológico y variaciones en el microbioma de lombrices de tierra expuestas a plaguicidas en suelos hortícolas de Zarcero. *Tesis*. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas.
- Camacho, L., Portillo, J., Rivera, A., Sánchez, J., Franco, R., Duque, J., Ishida, C. (2021). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cirugía y cirujanos*, 89(4), 426-434.
- Castellanos, R., Van der Graaf, L., Donado, P., Veldman, K., Duarte, F., Acuña, M., Zomer, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica Serovar Paratyphi B Variant Java in Poultry from Europe and Latin America. *Emerging Infectious Diseases*, 26(6), 1164-1173. doi:10.3201/eid2606.191121
- Chika, N., & Oghenekaro, N. (2019). Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic

- resistance genes. *Environmental Pollution*, 254, 1-15.  
doi:10.1016/j.envpol.2019.113067
- Cruz, J., Espinosa, S., & Medina, E. (2021). Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. *Alergia Asma Inmunol Pediátricas*, 30(2), 50-53. doi:10.35366/101642
- Doi, Y., & Arakawa, Y. (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *antimicrobial Resistance*, 45, 88-94. doi:https://doi.org/10.1086/518605
- Dong, Z., Jing, D., Yue, Y., Xin, K., O'Connor, P., & Yong, Z. (2020). Effects of Earthworms on the Microbiomes and Antibiotic Resistomes of Detritus Fauna and Phyllospheres. *Environmental Science & Technology*, 54(10), 6000-6008. doi:10.1021/acs.est.9b04500
- Fahri, F., Amaliah, R., Suryobroto, B., Atmowidi, T., & Nguyen, A. (2018). Three new "caecate" earthworm species from Sulawesi, Indonesia (Oligochaeta, Megascolecidae). *ZooKeys*, 805, 1-14. doi:10.3897/zookeys.805.24834
- Fernandes, M., Nóbrega, C., Villada, A., Grilo, M., Ramiro, Y., Cunha, E., Oliveira, M. (2022). Antimicrobial resistance and virulence profiles of Enterobacterales isolated from two-finger and three-finger sloths ( *Choloepus hoffmanni* and *Bradypus variegatus*) of Costa Rica. *PeerJ*, 10, 1-21. doi:10.7717/peerj.12911
- Fragoso, C., & Rojas, P. (2014). Biodiversidad de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta: Crassiclitellata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 197-207.
- Goswami, P., Gyles, C., Friendship, R., Poppe, C., Kozak, G., & Boerlin, P. (2008). Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine post-weaning diarrhoea

- induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 131(4), 400-405. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.007>
- Grdiša, M., Gršić, K., & Grdiša, M. (2013). Earthworms - role in soil fertility to the use in medicine and as a food. *Invertebrate Survival Journal*, 10(1), 38-45.
- Hu, L., Qiu-Ping, L., Qiang, P., Xiao-Ru, Y., Xin-Li, A., Dong, Z., & Jian-Qiang, S. (2022). Earthworms reduce the dissemination potential of antibiotic resistance genes by changing bacterial co-occurrence patterns in soil. *Journal of Hazardous Materials*, 426, 1-3. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128127>
- INEC. (2020). Área en kilómetros cuadrados, según provincia, cantón y distrito administrativo. *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. INEC.
- Jiang, L., Hu, X., Xu, T., Zhang, H., Sheng, D., & Yin, D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *10.1016/j.scitotenv.2013.04.038*, 458, 267-272. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.038
- Keenum, I., Liguori, K., Calarco, J., Davis, B., Milligan, E., Harwood, V., & Pruden, A. (2022). A framework for standardized qPCR-targets and protocols for quantifying antibiotic resistance in surface water, recycled water and wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(24), 4395–4419. doi:<https://doi.org/10.1080/10643389.2021.2024739>
- Kim, M., & Hong, Y. (2022). Complete mitochondrial genome of the earthworm *Amyntas seungpanensis* (Clitellata: Megascolecidae). *Mitochondrial DNA B Resour*, 7(6), 989-991. doi:10.1080/23802359.2022.2080604

- Kui, H., Hui, X., Yingying, Z., Jianhui, L., Guangyu, C., Fusheng, L., Nan, W. (2020). Elimination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria by earthworms during vermicomposting of dewatered sludge by metagenomic analysis. *Bioresource Technology*, 1-37.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122451>
- Kumar, V., Shriram, V., Paul, A., & Thakur, M. (2022). *Antimicrobial Resistance: Underlying Mechanisms and Therapeutic Approaches* (1 ed.). Singapore: Springer.
- Lazo, S., Zumbado, L., Duarte, F., Romero, J., Arias, M., & Muñoz, L. (2021). Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Campylobacter* spp. Isolated from Broiler Chicken at Three Levels of the Poultry Production Chain in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 84(12), 2143-2150.  
doi:10.4315/JFP-21-111
- Luna, C., Correa, M., Cedeño, H., & Caballero, M. (2006). Estudios sobre los patrones de uso de antibióticos y los factores de relevancia en el surgimiento de la resistencia bacteriana en fincas lecheras artesanales de Costa Rica. *Ciencias Veterinarias*, 24(2), 151-165.
- Marin, G., Giangreco, L., Dorati, C., Mordujovich, P., Boni, S., Ponte, H., Castro, J. (2022). Antimicrobial Consumption in Latin American Countries: First Steps of a Long Road Ahead. *Journal of Primary Care & Community Health*, 13, 1-11.  
doi:doi: 10.1177/21501319221082346
- Marti, E., & Balcázar, J. (2013). Real-Time PCR Assays for Quantification of *qnr* Genes in Environmental Water Samples and Chicken Feces. *PUBLIC HEALTH MICROBIOLOGY*, 79(5). doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.03409-12>

- Martínez, I., Soto, J., & Lahora, A. (2020). Antibióticos como contaminantes emergentes. Riesgo ecotoxicológico y control en aguas residuales y depuradas. *Ecosistemas*, 29(3), 1-9. doi:<https://doi.org/10.7818/ECOS.2070>
- Mcewen, S., & Collignon, P. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2), 1-26. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
- Mellado, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, 3(30), 88-111.
- Merchán, M., Torres, M., & Díaz, A. (2018). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 769-807.
- Montiel, J. (2020). Determinación de la ecotoxicidad de contaminantes emergentes farmacológicos y efluentes contaminados selectos de Costa Rica mediante la aplicación de bioensayos durante el periodo 2019. *TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE LICENCIATURA EN SALUD AMBIENTAL. UNIVERSIDAD DE COSTA RICA.*
- Mujawar, S., Abdella, B., & Lahiri, C. (2021). *Antimicrobial Resistance - A One Health Perspective*. Intechopen.
- OMS. (2016). *PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
- Pachés, M. (2020). *Contaminantes emergentes*. Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/142675/Pach%C3%A9s%20-%20Contaminantes%20emergentes.pdf?sequence=1>

Peng, J.-j., Balasubramanian, B., Ming, Y.-y., Niu, J.-l., Yi, C.-m., Ma, Y., & Liu, W.-c. (2021). Identification of antimicrobial resistance genes and drug resistance analysis of *Escherichia coli* in the animal farm environment. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1788-1795. doi:

10.1016/j.jiph.2021.10.025

Pérez, A. (2020). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%C3%B3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf>

Rojas, E., Jiménez, M., Barquero, E., Duarte, F., Mollenkopf, D., Wittum, T., & Muñoz, L. (2023). Prevalence Estimation, Antimicrobial Susceptibility, and Serotyping of *Salmonella enterica* Recovered from New World Non-Human Primates (Platyrrhini), Feed, and Environmental Surfaces from Wildlife Centers in Costa Rica. *Antibiotics*, 5, 844-859.

doi:10.3390/antibiotics12050844

Rojas, J., Brenes, E., Alcázar, P., Arguedas, R., & Barquero, E. (2019).

Pansusceptible *Escherichia coli* isolates obtained from faeces of free-ranging Baird's tapirs (*Tapirus bairdii*) suggests a low selective pressure for resistance determinants in the northwestern region of the Talamanca Mountain Range, Costa Rica. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 140-143.

doi:10.1016/j.jgar.2018.09.014

- Samreen, Ahmad, I., Malak, H., & Abulreesh, H. (2021). Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 27, 101-111. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145152
- Schmelz, R., Erséus, C., Martin, P., Van Haaren, T., & Timm, T. (2021). A proposed order-level classification in Oligochaeta (Annelida, Clitellata). *Zootaxa*, 5040(4), 589-597. doi:https://doi.org/10.11646/zootaxa.5040.4.9
- Septimus, E. (2018). Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. *The Medical clinics of North America*, 102(5), 819-829. doi:10.1016/j.mcna.2018.04.005
- Shi, Z., Tang, Z., & Wang, C. (2017). A brief review and evaluation of earthworm biomarkers in soil pollution assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 13284-13294. doi:10.1007/s11356-017-8784-0
- Stanley, D., Batacan, R., & Sharma, Y. (2022). Rapid growth of antimicrobial resistance: the role of agriculture in the problem and the solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(21), 6953-6962. doi:10.1007/s00253-022-12193-6
- Storteboom, H., Arabi, M., David, J., Crimi, B., & Pruden, A. (2010). Identification of Antibiotic-Resistance-Gene Molecular Signatures Suitable as Tracers of Pristine River, Urban, and Agricultural Sources. *Environmental Science & Technology*, 44(6), 1947-1953. doi:https://doi.org/10.1021/es902893f
- Suhartono, S., & Savin, M. (2016). Conjugative transmission of antibiotic-resistance from stream water *Escherichia coli* as related to number of sulfamethoxazole but not class 1 and 2 integrase genes. *Mobile Genetic Elements*, 6(6), 1-9. doi:https://doi.org/10.1080/2159256X.2016.1256851

- Tolosi, R., Carraro, L., Laconi, A., & Piccirillo, A. (2021). Optimization of five qPCR protocols toward the detection and the quantification of antimicrobial resistance genes in environmental samples. *MethodsX*, 8, 1-8.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101488>
- Torrades, S. (2021). Uso y abuso de los antibióticos. *ElSevier*, 20(8), 82-93.
- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5(3), 240-245.  
doi:10.1016/s1369-5274(02)00324-7
- Torumkuney, D., Smayevsky, J., Relloso, M., Sucari, A., Pennini, M., Brilla, E., Morrissey, I. (2020). Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2015-17 in Latin America (Argentina, Chile and Costa Rica): data based on CLSI, EUCAST (dose-specific) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) breakpoints. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(1), i42-i59.  
doi:10.1093/jac/dkaa083
- Vargas, S., Hernández, F., Fabregat, D., Salas, D., Quesada, F., Botero, A., Blanco, K. (2024). A case study on pharmaceutical residues and antimicrobial resistance genes in Costa Rican rivers: A possible route of contamination for feline and other species. *Environmental Research*, 242.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117665>
- Xu, L., Chen, H., Canales, M., & Ciric, L. (2019). Use of synthesized double-stranded gene fragments as qPCR standards for the quantification of antibiotic resistance genes. *Journal of Microbiological Methods*, 164.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105670>
- Yoo, M., Huh, M., Kim, E., Lee, H., & Jeong, H. (2003). Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain

reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments.

*Aquaculture*, 217(4), 11-21. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00169-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00169-2)

2

Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Lassáková, S., Korabecná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR

past, present and future. *BioTechniques*, 69(4), 1-10. doi:10.2144/btn-2020-

0057

## CAPÍTULO IX. APÉNDICES Y ANEXOS

### Apéndice 1.

*Encuesta para determinar posibles rutas de exposición.*

<b>1. Tipo de explotación</b> <input type="radio"/> Pecuaria <input type="radio"/> Agrícola
<b>2. Tipo de manejo</b> <input type="radio"/> Industria <input type="radio"/> Convencional <input type="radio"/> Orgánica <input type="radio"/> Natural <input type="radio"/> Buenas prácticas
<b>3. Control de plagas</b> <input type="radio"/> Trampas <input type="radio"/> Plaguicidas <input type="radio"/> Microorganismos efectivos (EM)
<b>4. Tipos de plaguicida empleados</b> <input type="radio"/> Insecticida <input type="radio"/> Fungicida <input type="radio"/> Herbicida <input type="radio"/> Pesticida <input type="radio"/> NA
<b>5. Uso de plaguicidas con fármacos antibióticos en su composición</b> <input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No
<b>6. Tipos de producciones colindantes</b> <input type="radio"/> Agrícolas <input type="radio"/> Pecuarias <input type="radio"/> Mixtas
<b>7. Cuerpos de ríos dentro de la finca</b> <input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No
<b>8. Tipo de abono empleado en la producción</b> <input type="radio"/> Orgánico <input type="radio"/> Químico
<b>9. Marcar el uso de cualquiera de los siguientes elementos</b> <input type="radio"/> Gallinaza <input type="radio"/> Cerdaza <input type="radio"/> Caballaza <input type="radio"/> Cabraza <input type="radio"/> Biocompost <input type="radio"/> Lombricompost <input type="radio"/> Biofermentos
<b>10. Asentamientos humanos cercanos</b> <input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No
<b>11. Centros de salud cercanos</b> <input type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No
<b>12. El agua empleada en la producción proviene de:</b> <input type="radio"/> Naciente <input type="radio"/> Pozo <input type="radio"/> Acueducto <input type="radio"/> Río (bomba)

Fuente: Elaboración propia.

## Apéndice 2.

*Cebadores empleados durante la realización del qPCR.*

<b>Gen</b>	<b>Secuencia (5'→3'; forward/reverse)</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>ermB</i></b>	CCGAACACTAGGGTTGCTC / ATCTGGAACATCTGTGGTATG	Tolosi et al. (2021)
<b><i>catII</i></b>	GATTGACCTGAATACCTGGAA/ CCATCACATACTGCATGATG	Yoo et al. (2003)
<b><i>qnrS</i></b>	GACGTGCTAACTTGC GTGAT/ TGGCATTGTTGGAAACTTG	Marti & Balcázar (2013)
<b><i>tetA</i></b>	TCAATTTCTGACGGGCTG/ GAAGCGAGCGGGTTGAGAG	Keenum et al. (2022)
<b><i>tetB</i></b>	CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC/ CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG	Goswami et al. (2008)
<b><i>tet Q</i></b>	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG/ CGGAGTGTC AATGATATTGCA	Xu et al. (2019)
<b><i>tet W</i></b>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC/ GGGCGTATCCACAATGTTAAC	Aminov et al. (2001)
<b><i>sul I</i></b>	CACCGGAAACATCGCTGCA / AAGTTCCGCCGCAAGGCT	Suhartono & Savin (2016)
<b><i>sul II</i></b>	CTCCGATGGAGGCCGGTAT/ GGGAATGCCATCTGCCTTGA	Xu et al. (2019)

### Apéndice 3.

*Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo orgánico.*

<p>1. Tipo de explotación</p> <p><input type="radio"/> Pecuaria <input checked="" type="radio"/> Agrícola</p>
<p>2. Tipo de manejo</p> <p><input type="radio"/> Industria <input type="radio"/> Convencional <input checked="" type="radio"/> Orgánica <input type="radio"/> Natural <input type="radio"/> Buenas prácticas</p>
<p>3. Control de plagas</p> <p><input checked="" type="radio"/> Trampas <input type="radio"/> Plaguicidas <input checked="" type="radio"/> Microorganismos efectivos (EM)</p>
<p>4. Tipos de plaguicida empleados</p> <p><input type="radio"/> Insecticida <input type="radio"/> Fungicida <input type="radio"/> Herbicida <input checked="" type="radio"/> Pesticida <input type="radio"/> NA</p>
<p>5. Uso de plaguicidas con fármacos antibióticos en su composición</p> <p><input type="radio"/> Sí <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p>6. Tipos de producciones colindantes</p> <p><input type="radio"/> Agrícolas <input type="radio"/> Pecuarias <input checked="" type="radio"/> Mixtas</p>
<p>7. Cuerpos de ríos dentro de la finca</p> <p><input type="radio"/> Sí <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p>8. Tipo de abono empleado en la producción</p> <p><input checked="" type="radio"/> Orgánico <input type="radio"/> Químico</p>
<p>9. Marcar el uso de cualquiera de los siguientes elementos</p> <p><input checked="" type="radio"/> Gallinaza <input type="radio"/> Cerdaza <input type="radio"/> Caballaza <input type="radio"/> Cabraza</p> <p><input checked="" type="radio"/> Biocompost <input type="radio"/> Lombricompost <input checked="" type="radio"/> Biofermentos</p>
<p>10. Asentamientos humanos cercanos</p> <p><input checked="" type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No</p>
<p>11. Centros de salud cercanos</p> <p><input checked="" type="radio"/> Sí <input type="radio"/> No</p>
<p>12. El agua empleada en la producción proviene de:</p> <p><input checked="" type="radio"/> Naciente <input type="radio"/> Pozo <input type="radio"/> Acueducto <input checked="" type="radio"/> Río (bomba)</p>

Fuente: Elaboración propia.

#### Apéndice 4.

*Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo convencional.*

<p>1. Tipo de explotación</p> <p><input type="radio"/> Pecuaria    <input checked="" type="radio"/> Agrícola</p>
<p>2. Tipo de manejo</p> <p><input type="radio"/> Industria    <input checked="" type="radio"/> Convencional    <input type="radio"/> Orgánica    <input type="radio"/> Natural    <input type="radio"/> Buenas prácticas</p>
<p>3. Control de plagas</p> <p><input checked="" type="radio"/> Trampas    <input checked="" type="radio"/> Plaguicidas    <input checked="" type="radio"/> Microorganismos efectivos (EM)</p>
<p>4. Tipos de plaguicida empleados</p> <p><input checked="" type="radio"/> Insecticida    <input checked="" type="radio"/> Fungicida    <input checked="" type="radio"/> Herbicida    <input checked="" type="radio"/> Pesticida    <input type="radio"/> NA</p>
<p>5. Uso de plaguicidas con fármacos antibióticos en su composición</p> <p><input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p>6. Tipos de producciones colindantes</p> <p><input type="radio"/> Agrícolas    <input type="radio"/> Pecuarias    <input checked="" type="radio"/> Mixtas</p>
<p>7. Cuerpos de ríos dentro de la finca</p> <p><input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p>8. Tipo de abono empleado en la producción</p> <p><input checked="" type="radio"/> Orgánico    <input checked="" type="radio"/> Químico</p>
<p>9. Marcar el uso de cualquiera de los siguientes elementos</p> <p><input checked="" type="radio"/> Gallinaza    <input type="radio"/> Cerdaza    <input checked="" type="radio"/> Caballaza    <input checked="" type="radio"/> Cabraza</p> <p><input type="radio"/> Biocompost    <input checked="" type="radio"/> Lombricompost    <input type="radio"/> Biofermentos</p>
<p>10. Asentamientos humanos cercanos</p> <p><input checked="" type="radio"/> Sí    <input type="radio"/> No</p>
<p>11. Centros de salud cercanos</p> <p><input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p>12. El agua empleada en la producción proviene de:</p> <p><input checked="" type="radio"/> Naciente    <input type="radio"/> Pozo    <input type="radio"/> Acueducto    <input checked="" type="radio"/> Río (bomba)</p>

Fuente: Elaboración propia.

## Apéndice 5.

*Encuesta realizada al productor encargado de la explotación catalogada como manejo con buenas prácticas agropecuarias.*

<p><b>1. Tipo de explotación</b>  <input type="radio"/> Pecuaria    <input checked="" type="radio"/> Agrícola</p>
<p><b>2. Tipo de manejo</b>  <input type="radio"/> Industria    <input type="radio"/> Convencional    <input type="radio"/> Orgánica    <input type="radio"/> Natural    <input checked="" type="radio"/> Buenas prácticas</p>
<p><b>3. Control de plagas</b>  <input checked="" type="radio"/> Trampas    <input type="radio"/> Plaguicidas    <input checked="" type="radio"/> Microorganismos efectivos (EM)</p>
<p><b>4. Tipos de plaguicida empleados</b>  <input type="radio"/> Insecticida    <input type="radio"/> Fungicida    <input type="radio"/> Herbicida    <input type="radio"/> Pesticida    <input checked="" type="radio"/> NA</p>
<p><b>5. Uso de plaguicidas con fármacos antibióticos en su composición</b>  <input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p><b>6. Tipos de producciones colindantes</b>  <input type="radio"/> Agrícolas    <input checked="" type="radio"/> Pecuarias    <input type="radio"/> Mixtas</p>
<p><b>7. Cuerpos de ríos dentro de la finca</b>  <input checked="" type="radio"/> Sí    <input type="radio"/> No</p>
<p><b>8. Tipo de abono empleado en la producción</b>  <input checked="" type="radio"/> Orgánico    <input type="radio"/> Químico</p>
<p><b>9. Marcar el uso de cualquiera de los siguientes elementos</b>  <input type="radio"/> Gallinaza    <input type="radio"/> Cerdaza    <input type="radio"/> Caballaza    <input type="radio"/> Cabraza  <input checked="" type="radio"/> Biocompost    <input checked="" type="radio"/> Lombricompost    <input checked="" type="radio"/> Biofermentos</p>
<p><b>10. Asentamientos humanos cercanos</b>  <input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p><b>11. Centros de salud cercanos</b>  <input type="radio"/> Sí    <input checked="" type="radio"/> No</p>
<p><b>12. El agua empleada en la producción proviene de:</b>  <input checked="" type="radio"/> Naciente    <input type="radio"/> Pozo    <input type="radio"/> Acueducto    <input type="radio"/> Río (bomba)</p>

Fuente: Elaboración propia.

## Apéndice 6.

Caracterización de las fincas de donde provienen las muestras con ARGs expresados, según su tipo de manejo.

Muestra	Procedencia	tetB	tetQ	tetW	sull	sulll	catll	qnrS	bla <sub>TEM</sub>	Control de plagas	Tipos plaguicidas	Producciones cercanas	Río	Tipo abonos	Abono	Asentamientos	Centros de salud	Fuente agua
LI23	Finca orgánica	-	-	-	0,75 22	-	-	-	-	Trampas, ME	Pesticidas orgánicos	Mixto	Sí	Orgánico	Biocompost, Lombricompost, Biofermentos	Si	No	Naciente, Río
LI21	Finca orgánica	-	-	-	0,23 41	-	-	-	-	Trampas, ME	Pesticidas orgánicos	Mixto	Sí	Orgánico	Biocompost, Lombricompost, Biofermentos	Si	No	Naciente, río
LI29	Finca orgánica	-	-	-	2,65 96	-	-	-	-	Trampas, ME	Pesticidas orgánicos	Mixto	Sí	Orgánico	Biocompost, Lombricompost, Biofermentos	Si	No	Naciente, río
S25	Finca orgánica	-	-	-	-	-	-	-	0,383	Trampas, ME	Pesticidas orgánicos	Mixto	Sí	Orgánico	Biocompost, Lombricompost, Biofermentos	Si	No	Naciente, río
LI4	Finca buenas prácticas	-	-	-	-	-	-	-	-2,2603	Trampas	NA	Pecuarías	Sí	Orgánico	Biocompost, Biofermentos	No	No	Naciente
S4	Finca buenas prácticas	-	-	-	-	-	-	-	1,5479	Trampas	NA	Pecuarías	Sí	Orgánico	Biocompost, Biofermentos	No	No	Naciente
SH	Orgánico	-	-	0,001 2	-	0,002 8	0,00 085	0,003 3	-	Trampas, ME	Pesticidas orgánicos	Mixto	Si	Orgánico	Biocompost, Lombricompost, Biofermentos	Si	No	Naciente, río
SB	Bosque	-	-	0,001 4	-	-	-	0,002 1	-	NA	NA	NA	Si	NA	NA	Si	No	Naciente
SM	BP	-	27,3	0,04	-	-	-	-	-	Trampas	NA	Pecuarías	Si	Orgánico	Biocompost, Biofermentos	No	No	Naciente
SL	Convencional	2,17	0,096	0,002 2	0,04 3	-	-	-	-	Trampas, ME y Plaguicidas	Insecticidas, fungicidas, herbicidas	Mixto	Si	Químico	Gallinaza, Cabraza, Caballaza, Lombricompost	Si	Si	Naciente, río

Nota: NA (No aplica).

## Anexo 1.

### Permiso de CONAGEBIO

**POR TANTO,  
LA DIRECTORA EJECUTIVA DE LA OFICINA TECNICA**

**RESUELVE:**

**PRIMERO:** Aprobar a Universidad Nacional, cédula jurídica 4000042150, representada legalmente por Jorge Herrera Murillo, cédula 205330454, la solicitud de acceso para el proyecto de Investigación Básica denominado "Programa de Laboratorio de Estudios Ecotoxicológicos (Ecotox)-IRET (código SIA 0263-17): Evaluación de biomarcadores en lombrices de tierra colectadas en parcelas agrícolas con diferente uso de plaguicidas", de conformidad con el contrato para el otorgamiento del consentimiento previamente informado, el formulario de Guía Técnica y los siguientes términos:

1. Material a accesar:

Muestras In Situ:

Género y especies	Tipo de Muestra	Cantidad de muestra	Número de muestras por sitio de acceso
Annelida, Lumbricidae	Individuos enteros	60	3



San José, 24 de mayo de 2024

SF-079-2024

Señor  
**Josué Rivera Castillo, DMV**  
**Director de Carrera de Medicina Veterinaria**  
**Universidad Técnica Nacional, Sede Atenas**  
S. D.

Estimado Director:

Al suscrito profesional en Filología y Lingüística, le complace dar fe que el Trabajo Final de Graduación titulado “**Presencia de genes de resistencia antimicrobiana en lombrices de tierra de suelos hortícolas de Zarcero, Alajuela, como indicadores de la salud ecosistémica de la zona**” escrito por Rebeca de Jesús Delgado González cédula de identidad número 4-0229-0559, para optar por el grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, fue sometido a revisión filológica.

Se han revisado y corregido errores gramaticales, de puntuación y ortografía, construcción de párrafos, vicios del lenguaje, intención comunicativa, citación, coherencia y otros aspectos relacionados con el campo filológico, que se manifestaron en el documento escrito. Desde ese punto de vista, considero que, con las correcciones realizadas en el documento, está listo para ser presentado como trabajo final de graduación, por cuanto cumple con los requisitos para estos fines.

De usted, atentamente,

A handwritten signature in blue ink that reads "Gustavo E. Castro M." with a stylized flourish at the end.

---

**Lic. Gustavo Castro Miranda**  
**Carné #29873**  
**Cédula 2-0463-0329**