



Universidad de Concepción Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

Influencia de la distancia de los centros de salmonicultura en la presencia y nivel relativo de expresión de genes que codifican resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en comunidades bacterianas del fiordo Puyuhuapi, región de Aysén.



Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención Microbiología

PAULINA ANDREA GONZÁLEZ MUÑOZ

CONCEPCIÓN-CHILE

2019

Profesor Guía: Dr. Gerardo González Rocha Profesor Co-
Guía: Dr. Marcelo Gutiérrez Astete Departamento de
Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de
Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Marcelo Gutiérrez Astete Facultad de
Oceanografía Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Helia Bello Toledo
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

Dr. Homero Urrutia Briones
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

Dra. Celia A. Lima
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción

DEDICATORIA

Dedico esta tesis todos aquellos que me han apoyado e impulsado en este largo camino, especialmente a mi tata Efraín, el motivo por el que todo esto empezó.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos quienes han contribuido al desarrollo de este trabajo. Primero a mis profesores, Gerardo González, Marcelo Gutiérrez, Mariana Domínguez, Helia Bello y Celia A. Lima, quienes de una u otra forma me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo. A la gran familia del LIAA le agradezco haberme hecho parte de ella. Pero sobre todo agradezco las personas que me entregó, entre los cuales fui afortunada de encontrar muy buenos amigos y además, a mi futuro esposo.

También quiero agradecer a los fondos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo mediante el Financiamiento parcial de COPAS Sur-Austral CONICYT PIA BASAL PFB31 y APOYO CCTE AFB170006.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, mi abuelita Ana, mi tía Pati, mis padres Manuel y Rosemarie, mis hermanas Camina y Sara, a mi sobrina Julieta y mi novio Andrés. Gracias por su paciencia y el apoyo realmente incondicional que he recibido de todos en este proceso que ha resultado tan complejo. Ustedes son los cimientos sobre los que he construido mi vida.

Estaré infinitamente agradecida.



TABLA DE CONTENIDO

- INDICE DE TABLAS	VII
- INDICE DE FIGURAS	VIII
- INDICE DE ABREVIATURAS	IX
- RESUMEN	X
- ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCION	1
1.1. HIPOTESIS	9
1.2. OBJETIVO	10
1.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
2. MATERIALES Y METODOS	12
2.1 Área de estudio y muestreo	12
2.2. Recuento bacteriano en muestras de agua y sedimento.	13
2.3. Determinación de la estructura comunitaria y genes de resistencia de las comunidades bacterianas en las muestras de agua.	13
2.3.1. Extracción de ADN y ARN.	13
2.3.2. Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana en las muestras de agua.	14
2.3.3. Determinación de la presencia de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua.	14
2.3.4. Determinación de los niveles de expresión relativos de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua.	15
2.4. Aislamiento, identificación y determinación fenotípica y genotípica de los perfiles de resistencia de los aislados cultivables heterotróficos aeróbicos.	16
2.4.1. Aislamiento de bacterias heterotróficas aeróbicas resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.	17
2.4.2. Identificación de los aislados resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.	17
2.4.3. Susceptibilidad de los aislados a los antibióticos	17

2.4.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tetraciclina y florfenicol.	18
2.4.5. Pesquisa de genes de resistencia a oxitetraciclina, florfenicol e integrones de clase 1 y 2.	18
3. RESULTADOS	19
3.1. Recuento bacteriano en muestras de agua y sedimento.	19
3.2. Estructura comunitaria y perfil de genes de resistencia de las comunidades bacterianas presentes en la columna de agua.	19
3.2.1. Patrones de diversidad bacteriana en la columna de agua.	19
3.2.2. Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua	23
3.3 Identificación y determinación fenotípica y genotípica de los perfiles de resistencia de los aislados cultivables heterotróficos aeróbicos.	26
3.3.1. Identificación de los aislados resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.	26
3.3.2. Susceptibilidad de los aislados a los antibióticos	26
3.3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tetraciclina y florfenicol.	27
3.3.4. Pesquisa de genes de resistencia a oxitetraciclina, florfenicol e integrones de clase 1 y 2.	28
4. DISCUSION	29
5. CONCLUSIONES	36
6. PROYECCIONES	38
7. REFERENCIAS	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Listado de partidores empleados para la detección y cuantificación de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol (diseñados en este estudio).	16
Tabla 2: Número de OTUs observados en cada muestra de agua analizada. Fuente: Elaboración propia.	20
Tabla 3: Presencia de genes de resistencia a florfenicol y oxitetraciclina en el ADN extraído de muestras de agua de las diferentes estaciones a diferentes profundidades. Fuente: Elaboración propia.	24
Tabla 4: Identificación de aislados bacterianos recuperados de muestras de agua del fiordo Puyuhuapi, en placas de agar con oxitetraciclina o florfenicol. Fuente: Elaboración propia.	26
Tabla 5: Comportamiento a varios antibióticos de las cepas aisladas desde muestras de agua del fiordo Puyuhuapi. Fuente: Elaboración propia.	27
Tabla 6: CMI50, CMI90 y media geométrica CMI, para las cepas incluidas en el estudio. Fuente: Elaboración propia.	27
Tabla 7: Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol pesquisados en los aislados recuperados en placas de agar marino con oxitetraciclina o florfenicol. Fuente: Elaboración propia.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: (A): Ubicación geográfica de la zona de muestreo que corresponde al canal Puyuhuapi, Región de Aysén (Rebolledo *et al.*, 2005). (B) Localización de las estaciones de muestreo. 12
- Figura 2: Recuento bacteriano total, vivas y muertas, según el criterio de integridad de membrana, en cada punto de muestreo, considerando el promedio de las tres profundidades muestreadas en cada estación. 19
- Figura 3: Resultado de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) realizado a las muestras de agua, donde M es el marcador de tamaño molecular (100pb) 20
- Figura 4: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi. E: Estación 1, E2: Estación 2, E-: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. 21
- Figura 5: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi en profundidad de 2 m (A), 50 m (B) y 100 m (C). E1: Estación 1, E2: Estación 2, E-: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. 22
- Figura 6: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para la presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol presentes en las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi. E: Estación 1, E2: Estación 2, E-: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. 25
- Figura 7: Gel de agarosa al 1% que muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la pesquisa de genes de resistencia en el cDNA. M: Marcador de tamaño molecular, rrs: control para ADNr16S de 320pb. 25

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

AMP: Ampicilina

ARN: Ácido ribonucleico

CMI: Concentración mínima inhibitoria

COPAS: Centro de Oceanografía del Pacífico Sur

CTX: Cefotaxima

DGGE: Electroforesis en gel con gradiente desnaturante

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FFC: Florfenicol

FLU: Flumequina

FOX: Cefoxitin

KAN: Kanamicina

MINAGRI: Ministerio de agricultura

NMDS: Escalamiento multidimensional no métrico

OTU: Unidad taxonómica operacional

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SERNAPESCA: Servicio nacional de pesca

TET: Tetraciclina



RESUMEN

Chile es uno de los principales productores de salmón a nivel mundial y esta actividad se desarrolla principalmente en el sur del país, particularmente en los fiordos y canales de la Región de Aysén.

Uno de los factores asociados a esta actividad es la alta utilización de antibióticos, ya que para producir una tonelada métrica de salmón se utiliza 1500 veces más antibióticos que en Noruega (primer productor a nivel mundial).

En este estudio, se tomaron muestras de agua a diferentes distancias de un centro de cultivo de salmónes ubicado en el fiordo Puyuhuapi, Región de Aysén. Los recuentos bacterianos se encontraron en la misma orden de magnitud en todos los sitios de muestreo, y con una relación entre vivas y muertas de 4:1 respectivamente. La electroforesis en gel con gradiente denaturante (DGGE) evidenció que la riqueza de OTUs fue similar en todas las estaciones de muestreo (20 OTUs); sin embargo, se observa una mayor similitud (73%) en la composición de estas comunidades bacterianas.

Se pesquisaron genes de resistencia a oxitetraciclina (*tetO*, *tetC*, *tet34*, *otrA* y *otrB*) y florfenicol (*floR* y *fexA*) en el ADN extraído de las muestras de agua, no obstante, estos no pudieron detectarse mediante RT-PCR lo que estaría evidenciando que al momento del muestreo estos genes no se estaban expresando. Además, mediante siembra en placas con presión selectiva, tetraciclina (5 µg/mL) o florfenicol (3 µg/mL), se aislaron seis cepas identificadas como *Pseudomonas fragi*, *Pseudoalteromonas nesutonica*, *Aliivibrio sifiae*, *Shewanella baltica*, *Providencia burhodogranariae* y *Vibrio tasmaniensis*. Cuatro de estos aislados portaban integrones de clase I, *P. burhodogranariae* y *A. sifiae* no portaban genes de resistencia en la región variable, mientras que *V. tasmaniensis* y *P. fragi* tenían el gen *aadA9* asociado al integrón detectado.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la actividad salmonícola tiene un evidente efecto sobre la composición de las comunidades bacterianas aledañas a los centros de cultivo; sin embargo, no se observó una relación entre la abundancia de los genes de resistencia pesquisados y la distancia

de las estaciones de muestreo desde el centro de cultivo, lo que permite rechazar la hipótesis planteada.

Finalmente, la información obtenida en este estudio sugiere que el ambiente marino estaría actuando como reservorio de genes de resistencia, y que la estructura de la comunidad bacteriana en el entorno directo de las balsas jaulas sería diferente a las comunidades de puntos más distantes, lo que podría deberse a la influencia de estos centros de cultivo.



ABSTRACT

Chile is the second largest salmon producer worldwide after Norway. This activity is developed mainly in the fjords and channels of the Aysen region, in the south of the country. Importantly, Chile uses 1500 times more antibiotics than Norway to produce one metric ton of salmon.

In this study, we analyzed water samples collected in different distances from salmon farms in Puyuhuapi fjord, Aysen region. Bacterial counts were in the same magnitude order in all samples sites, with a live/death rate of 4:1. We determined, by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), that the Operative Taxonomic Unit (OTU) richness was similar in the areas included in this study (20 OTUs). However, we observed a greater similarity (73%) in the composition of the structure of the bacterial community.

Additionally, the oxytetracycline-resistance genes *tetO*, *tetC*, *tet34*, *otrA* y *otrB* were detected, as well as the florfenicol resistance determinants *floR* y *fexA*. Even though these genes were identified in the total DNA from the water samples, they were not detected from total RNA, evidencing that they were not expressed.

Moreover, six isolates belonging to *Pseudomonas fragi*, *Pseudoalteromonas nesutonica*, *Aliivibrio sifiae*, *Shewanella baltica*, *Providencia burhodogranariea* y *Vibrio tasmaniensis* species were identified from plates supplemented with tetracycline (5 µg/mL) or florfenicol (3 µg/mL). Of these isolates, four harbored a class 1 integron, in which *P. burhodogranariea* y *A. sifiae* did not contain any antibiotic-resistance gene in their variable zone. Conversely, both *V. tasmaniensis* y *P. fragi* isolates carried the *aadA9* gene associated with class 1 integrons.

In conclusion, the results of this study evidenced that the salmon-farming activity has a relevant impact on the composition of the bacterial community nearby the fish culture centers. Nevertheless, there was not a significant difference among the abundance of antibiotic-resistance genes and the distance of the sampling sites from the culture center, thus the proposed hypothesis is rejected.

Finally, our study suggests that the marine environment could be acting as a reservoir of antibiotic-resistance genes. In addition, the structures of the bacterial

communities are significantly different in the area nearby the salmon cages, in comparison with those present in distant sites. These phenomena could be importantly influenced by the salmon farming centers, where antibiotics are normally used.



1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la resistencia a antibióticos es un problema global, principalmente debido a su incorrecta y a veces excesiva utilización en ambientes clínicos y productivos; como la agricultura, ganadería y acuicultura (S. McEwen y P. Collignon, 2018). Esta última actividad destaca en el desarrollo económico de Chile, donde la salmonicultura figura como uno de los tres principales productos de exportación (FAO, 2006) y cuyo desarrollo ha posicionado a Chile como el segundo mayor productor de salmónidos a nivel mundial, precedido sólo por Noruega con una producción de 900 toneladas en 2014 (SERNAPESCA, 2017a).

La salmonicultura incluye las siguientes etapas: generación y fertilización de ovas en pisciculturas; esmoltificación, con centros de cultivo en zonas estuarinas; y el desarrollo y maduración sexual, con centros de cultivo ubicados en ambientes marinos (Tapia y Giglio, 2010) protegidos de condiciones climáticas extremas, con una adecuada ventilación y tasa de recambio, que aseguren una buena calidad de las aguas y, por lo tanto, otorguen óptimas condiciones para el cultivo de salmones. En las regiones de Los Lagos y de Aysén, los fiordos y canales patagónicos (41°S al 56°S) se han identificado como zonas que permiten un desarrollo seguro de esta actividad (Buschmann *et al.*, 1996). Los fiordos y canales de la Patagonia ocupan un área aproximada de 240.000 km² (Pantoja *et al.*, 2011) y se caracterizan por ser altamente heterogéneos y dinámicos, con alta variabilidad temporal en los ciclos de mezcla y estratificación y en la disponibilidad de nutrientes (Iriarte *et al.* 2014). Sin embargo, su estructura general se caracteriza por una estratificación vertical, encontrándose una capa superficial de agua de baja salinidad (<11 a 30 PSU) que varía entre los 5-10 m y una capa de agua salina (>30 PSU) que ocupa los estratos sub-superficiales y profundos (Schneider *et al.*, 2014). Esta estructura se debe a que los fiordos y canales del sur de Chile están bajo la influencia del agua dulce proveniente principalmente de ríos, deshielos y precipitaciones que fluye

hacia fuera de los canales y de aguas oceánicas que entran y ocupan los estratos sub-superficiales y profundos de la columna de agua (Sievers y Silva, 2008). En esta zona de fiordos se encuentra el fiordo Puyuhuapi ($\sim 44^{\circ} 19' - 44^{\circ} 57'S$; Figura 1), que se conecta con el Canal de Moraleda por el sur y con el Jacaf por el norte. El fiordo Puyuhuapi, al igual que otros fiordos y canales de la zona austral del país, ha sido escenario del desarrollo de la salmonicultura. Esta actividad no está exenta de costos ambientales, ya que se estima que, en términos espaciales, la 'huella ecológica' (o impacto ambiental) generada por un centro de cultivo de salmones, puede llegar hasta 10.000 veces al entorno de la actividad misma (Folke, 1998), ya que conllevan a la modificación del ambiente directo y circundante; por ejemplo, mediante la liberación de alimento no consumido por los peces, que produce variaciones en la concentración de nutrientes, turbidez, concentraciones de oxígeno, conductividad y pH en la columna de agua (Buschmann *et al.*, 1996). De los nutrientes incorporados al ambiente marino, se ha estimado que el 80 – 88% del carbono, 52 – 95% del nitrógeno y 85% del fósforo terminan como químicos disueltos o material particulado en el ambiente marino (Bentzon-Tilia *et al.*, 2016). Estos compuestos se acumulan en el sedimento, lo que disminuye los niveles de oxígeno disponible, aumenta la producción de gases tóxicos, como los sulfuros, por actividad anaeróbica, lo que impacta la diversidad biológica de los sedimentos, permitiendo únicamente la sobrevivencia de aquellos organismos capaces de vivir en estas condiciones (Niklitschek *et al.*, 2013). Soto y Norambuena (2004) estudiaron los impactos de la salmonicultura en 29 zonas de cultivos de salmones en Chiloé y los fiordos del norte de la Patagonia. Estos autores, encontraron de 2 a 5 veces más nutrientes en la columna de agua y sedimento (nitrógeno, fósforo, carbono y materia orgánica particulada); además de una disminución de 50% de la riqueza de especies bacterianas bajo las balsas jaulas comparados con el control, ubicado a 1000 m desde las balsas jaulas.

Otro gran problema de la industria salmonícola está asociado al elevado uso de antibióticos en la crianza industrial de este recurso. Particularmente en Chile, para producir una tonelada métrica de salmón, se utiliza 1500 veces más antibióticos que en Noruega (Cabello *et al.*, 2013). Esto se refleja en las importaciones de

antibióticos en Chile, que durante el periodo comprendido entre 1998 y 2015, el 95% de las tetraciclinas, fenicoles y quinolonas (7.775 toneladas) fueron destinadas a uso veterinario (Millanao *et al.*, 2018). Estos, son utilizados para mantener bajo control a los patógenos responsables de las enfermedades infecciosas de estos peces, cuya proliferación se ve favorecida bajo las condiciones de altas densidades y deficientes medidas higiénicas que son encontradas dentro de las balsas jaulas de cultivo (Cabello *et al.*, 2013). Esto conlleva a la aparición de diversas enfermedades de origen fúngico, viral y bacteriano, que afectan a los peces, traducándose en pérdidas económicas para la industria debido al aumento de la morbilidad y mortalidad de los peces, reducción de los niveles de producción y productividad, y alteraciones reproductivas, que resultan en costos económicos elevados (San Martín *et al.*, 2010). Dentro de las patologías que afectan a los salmones se encuentra, la enfermedad bacteriana del riñón (BKD, del inglés *Bacterial Kidney Disease*), que es una infección sistémica de progresión lenta, con un curso prolongado y una naturaleza insidiosa, causada por un pequeño diplobacilo Gram positivo llamado *Renibacterium salmoninarum* (Fryer y Sanders, 1981) y que infecta a la trucha arco iris, el salmón del Atlántico y el salmón Coho a lo largo de todo su ciclo de producción. Otra ictiopatología importante corresponde a la piscirickettsiosis o septicemia rickettsial del salmón (SRS), cuyo agente etiológico es *Piscirickettsia salmonis* un patógeno Gram-negativo intracelular facultativo. La incidencia de la enfermedad es particularmente alta en el sur de Chile, donde se desencadena por cepas notablemente virulentas de esta especie (Saavedra *et al.*, 2018), que fue detectada por primera vez en el mundo en el sur de Chile en 1990 y que ha causado en nuestro país eventos con hasta un 90% de mortalidad de los salmones (Ibiza *et al.*, 2011), causando pérdidas económicas que se han estimado en más de 500 millones de dólares anuales (Maisey *et al.*, 2017). La vía de control de estos patógenos considerada más efectiva es el uso de antibióticos, los que pueden ser administrados por vía parenteral, que asegura que los peces reciben la dosis antibiótica necesaria para asegurar la eficacia del tratamiento (SAG, 2011), o por vía oral a través de alimentos medicados, los que además de sus atributos nutritivos, contienen medicamentos que le permiten prevenir o curar las enfermedades

(MINAGRI, 2006). Este tipo de administración de compuestos antibacterianos facilita el manejo y disminuye el costo; sin embargo, tiene como desventaja que no todos los peces reciben la misma dosis (Gonçalves *et al.*, 2007) y que una parte de los antibióticos es liberada a la columna de agua y a los sedimentos (San Martín *et al.*, 2010), principalmente en el alimento no consumido, que alcanza el 30%, y a través de los antibióticos consumidos no absorbidos que representan aproximadamente el 80% y que se liberan al ambiente mediante las heces, orina y otras secreciones (Cabello *et al.*, 2013). Los intentos de limitar los brotes y la diseminación de patógenos con antimicrobianos, probablemente, han llevado a la emergencia de aislados con una susceptibilidad reducida a diferentes agentes terapéuticos, lo que representa una preocupación importante, ya que sólo unos pocos principios activos están autorizados para el tratamiento del SRS, siendo los principales fármacos utilizados el florfenicol (FFC) y la oxitetraciclina (OTC) (Saavedra *et al.*, 2018). Si bien el florfenicol se degrada en pocos días, el florfenicol amina, uno de sus derivados, continúa en el sedimento por meses, siendo capaz de ejercer presión selectiva. La tetraciclina también puede encontrarse en sedimentos por meses, pudiendo permanecer asociada a cationes inhibidores como Mg^{2+} y Ca^{2+} , sin perder su actividad, manteniéndose en concentraciones subinhibitorias en el ambiente (Cabello *et al.*, 2013). La presencia de estos fármacos en el sistema acuático puede alterar la composición bacteriana de la microbiota presente en estos sistemas acuáticos, mediante la selección de aquellas bacterias que poseen genes que otorgan resistencia a estos antibióticos, los que además pueden ser transferidos hacia bacterias susceptibles, por alguno de los fenómenos de transferencia horizontal de genes (Huang *et al.*, 2017).

Para evitar la aparición de genes de resistencia a múltiples antibióticos de uso en terapia antiinfecciosa para humanos, en la salmonicultura el uso de estos compuestos ha sido constantemente modificado desde el inicio de esta actividad productiva (Zhang *et al.*, 2009). Actualmente, entre los fármacos autorizados por el Registro del Sistema de Medicamentos Veterinarios (SAG), para ser usados en Chile en actividades de acuicultura, se encuentran: florfenicol, oxitetraciclina, flumequina, eritromicina, amoxicilina y ácido oxolínico (Sernapesca, 2017). De

acuerdo al informe de uso de antimicrobianos publicado por SERNAPESCA en 2017, se ha informado el uso total de ca. 382 toneladas de antibióticos por año en la industria salmonera, de las cuales 4,8% se utilizaron en fase de cultivo en agua dulce y 95% fueron utilizados en centros de engorda marinos. Del total de antibióticos empleados a nivel nacional, oxitetraciclina y florfenicol fueron en conjunto, los compuestos más utilizados en ambas fases de cultivo (81.9% en agua dulce y 98.9% en fase marina). Específicamente, en la región de Aysén, se utilizó 50,5% del total de antibióticos administrados en fase marina, lo que corresponde a 189 toneladas de antibióticos.

Se estima que al menos 75% de los antibióticos administrados en acuicultura se diseminan en el ambiente circundante, lo que lleva a la acumulación de residuos antibióticos en sedimentos marinos, (Granada *et al.*, 2015). Esto impacta las comunidades bacterianas de ese ambiente, observándose, por ejemplo, una disminución de entre 50 a 70% en el recuento total de bacterias tras la administración de *pellet* medicado con oxitetraciclina, ácido oxolínico o florfenicol en microcosmos que contenían agua y sedimento marino (Hektoen *et al.*, 1995). Sin embargo, pese a que los antibióticos son considerados contaminantes químicos del medio ambiente (Kemper, 2008), aún no existe información suficiente para establecer los impactos de su utilización, ni las cantidades tolerables para el medio ambiente sin provocar cambios en la riqueza y composición de las comunidades microbianas las que podrían disminuir notablemente debido a la susceptibilidad frente a los antibióticos utilizados (Cabello *et al.*, 2013) o en caso contrario, seleccionar aquellas bacterias que sean altamente resistentes a antibióticos. Por lo tanto, las actividades antrópicas podrían afectar a las comunidades bacterianas no sólo produciendo un aumento de los genes de resistencia, sino que también induciendo modificaciones sobre el llamado “resistoma ambiental”, que está definido como el conjunto de genes de resistencia presentes en una comunidad bacteriana del ambiente (D’Costa *et al.*, 2006), incluso en microorganismos ambientales que no son considerados patógenos clínicos. La existencia de este resistoma ambiental es producto del continuo contacto de los microorganismos con diferentes moléculas tóxicas provenientes de diferentes fuentes, tales como metales inorgánicos, y

compuestos orgánicos sintetizados por otros microorganismos, plantas y animales (Surette y Wright, 2017). Un ejemplo de las variaciones en el resistoma ambiental se observó en Holanda, donde hubo un aumento de 2 a 15 veces en la abundancia de genes de resistencia bacteriana en suelos desde 1975 a 2008, lo que fue atribuido a un aumento en la industrialización del país (Finley *et al.*, 2013). La constante utilización de antibióticos en concentraciones subinhibitorias, como medida profiláctica, es especialmente relevante; ya que esta práctica está estrechamente relacionada con el surgimiento y la propagación de bacterias resistentes, debido a que los antibióticos pueden estimular la transferencia horizontal de genes mediante la captación de ADN proveniente de bacteriófagos (Cabello *et al.*, 2013), mientras que la transferencia de genes de resistencia se vería favorecida, ya que las plataformas genéticas donde estos genes se encuentran insertos, como plásmidos, transposones e integrones, pueden ser transferidas entre bacterias por conjugación (Alonso *et al.*, 2001; Baquero *et al.*, 2008, Keen y Montfort, 2012). Estas plataformas pueden portar genes de resistencia a más de un antibiótico, lo que permite que sean seleccionados por cualquier otra droga para la cual codifiquen resistencia. Así es el caso de plásmidos que median resistencia a cloranfenicol, trimetoprim, sulfonamidas y tetraciclinas, los que han sido identificados en patógenos de peces, donde la presión ejercida por sólo un antibiótico, selecciona el plásmido completo, y por lo tanto le otorga resistencia a más de un compuesto (Miranda y Zemelman, 2002). Esta co-selección de genes de resistencia aumenta la posibilidad de la emergencia de bacterias multiresistentes (Miranda y Zemelman 2002) y permite la diseminación de estos genes a bacterias susceptibles de otras especies que se encuentren sometidas a la misma presión de selección (Cabello, 2013). Este fenómeno podría ser muy significativo en el ambiente marino, donde se ha encontrado que el 44% de los genes de resistencia a antibióticos fueron pesquisados en taxa marinos recurrentes, tales como; *Pelagibacter*, *Prochlorococcus*, y *Vibrio* (Hatosy y Martin, 2015),

En Chile la utilización de compuestos antibacterianos en la acuicultura es una práctica ampliamente utilizada, según el informe emitido por el servicio nacional de pesca (SERNAPESCA) sólo en la industria productora de

salmones se utilizaron más de 5500 toneladas de antibióticos entre 2007 y 2017, lo que indica que cada tonelada de salmón producido recibiría 500g de antibióticos (Higuera-Llantén *et al.*, 2018). Las grandes cantidades de antibióticos utilizados y el prolongado tiempo de esta práctica, hacen relevante estudiar la presencia y distribución de genes de resistencia asociados a estos compuestos, particularmente en ambientes donde la presión de selección sería elevada.

En el caso de las tetraciclinas los genes de resistencia se encuentran ampliamente estudiados (Gonçalves *et al.*, 2007) y se observan diferentes mecanismos de acción tales como bombas de expulsión, proteínas de protección ribosomal, disminución en la permeabilidad de la membrana (lo que disminuye el ingreso del antibiótico), mutación en el sitio blanco e inactivación enzimática del antibiótico (Markley y Wencewicz, 2018). Dentro de estos genes, se encuentran, por ejemplo, los genes *otr(B)* y *tet(C)*, que codifican para bombas de expulsión, que corresponden a proteínas asociadas a las membranas de bacterias Gram positiva y Gram negativa que reconocen y exportan oxitetraciclina desde el interior de la célula (Jun *et al.*, 2004; Nikolakopoulou *et al.*, 2005; Thaker *et al.*, 2010). Están también los genes *ort(A)* y *tet(O)*, cuyo mecanismo de acción es la síntesis de proteínas que se unen al ribosoma alterando la conformación de éste, lo que impide la unión del antibiótico en el sitio blanco (Nikolakopoulou *et al.*, 2005; Thaker *et al.*, 2010) y por último, el gen *tet(34)*, que actuaría como una xantina-guanina fosforribosil transferasa, disminuyendo la actividad de tetraciclinas (Markley y Wencewicz, 2018).

En el caso del florfenicol, el gen de resistencia más abundante es el gen *floR* que codifica para una bomba de expulsión en bacterias Gram negativas (Fernández-Alarcón *et al.*, 2008), así como el gen *fex(A)* que codifica similar mecanismo sólo en bacterias Gram positivas y, por último, el gen *cfr* cuyo mecanismo de acción es la metilación del ARN ribosomal y que además de otorgar resistencia a fenicoles (cloranfenicol y florfenicol), es eficaz contra lincosamidas, oxazolidinonas, pleuromutilinas y estreptograminas (Vester, 2018).

La resistencia a oxitetraciclina en comunidades bacterianas asociadas a la salmonicultura ha sido ampliamente estudiada (Coyne *et al.*, 2004; Kerry *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2003). En Chile algunos estudios realizados en bacterias

provenientes de la columna de agua en zonas de salmonicultura muestran que dicha resistencia permanece incluso cuando no se está utilizando terapia antibiótica, lo que indica la persistencia en el tiempo del efecto selectivo ejercido por estos compuestos (Miranda y Zemelman, 2002; Miranda *et al.*, 2003). Lo que puede resultar en un potencial cambio en la ecología de comunidades microbianas. Por el contrario, la información respecto de la resistencia antibiótica producida por la utilización de florfenicol en la industria salmonera es escasa; sin embargo, se ha determinado que al igual que en el caso de la oxitetraciclina, la presencia de los determinantes de resistencia a florfenicol se detectan pese a que no se esté utilizando terapia antibiótica en el momento del análisis, además se ha determinado que el porcentaje de bacterias resistentes es menor en la columna de agua que en sedimentos bajo las balsas jaulas (5,5% y 18,5% respectivamente) (Miranda y Rojas 2007). Lo anterior puede ser atribuido a la alta tasa de sedimentación de los *pellets* medicados y la importante fracción de alimento que no es consumido por los salmones. Por lo tanto, Es importante recabar más información respecto de la resistencia a antibióticos en la comunidades bacterianas que habitan zonas aledañas a centros de cultivo de salmones, y además, evaluar posibles cambios en la composición de dicha comunidad.

1.1 HIPÓTESIS

La presencia y expresión de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol, en la comunidad bacteriana de zonas aledañas a centros de cultivos de salmones en el canal Puyuhuapi, disminuye a medida que aumenta la distancia desde las balsas jaula.



1.2 OBJETIVO

Determinar la presencia y expresión de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en comunidades bacterianas y relacionarla con la distancia desde un centro de salmonicultura en el canal Puyuhuapi, Región de Aysén.



1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en la comunidad bacteriana, a lo largo de un gradiente de influencia de centros de salmonicultura en el canal Puyuhuapi.
2. Determinar el nivel de expresión de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol detectados en la comunidad bacteriana del canal Puyuhuapi.
3. Determinar las variaciones en la composición de la comunidad bacteriana a lo largo de un gradiente de influencia de centros de salmonicultura en el canal Puyuhuapi.



2.0. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio y muestreo.

Se realizó un muestreo en el Canal Puyuhuapi, Región de Aysén ($44^{\circ} 35.286'$ Sur y $72^{\circ} 43.625'$ Oeste) en Julio de 2015, determinando 4 estaciones de muestreo ubicadas a 50, 80, 120 y 200 m de un centro de cultivo de salmones (Figura 1). Utilizando botellas Niskin se obtuvieron muestras de agua de 10 L a 2, 15 y 50 m de profundidad de manera de cubrir la capa superficial de agua dulce, la capa intermedia o zona de mezcla y la capa subsuperficial de agua más salina. Estas muestras fueron almacenadas en bidones estériles durante el periodo de muestreo (4 – 6 h) previo a su procesamiento. Se consideró como control negativo (alejado de centros de cultivos de salmones) la estación de observación oceanográfica del Centro de Investigación COPAS Sur-Austral, la que se encuentra ubicada aproximadamente a 1.800 m desde el centro de cultivo más cercano.

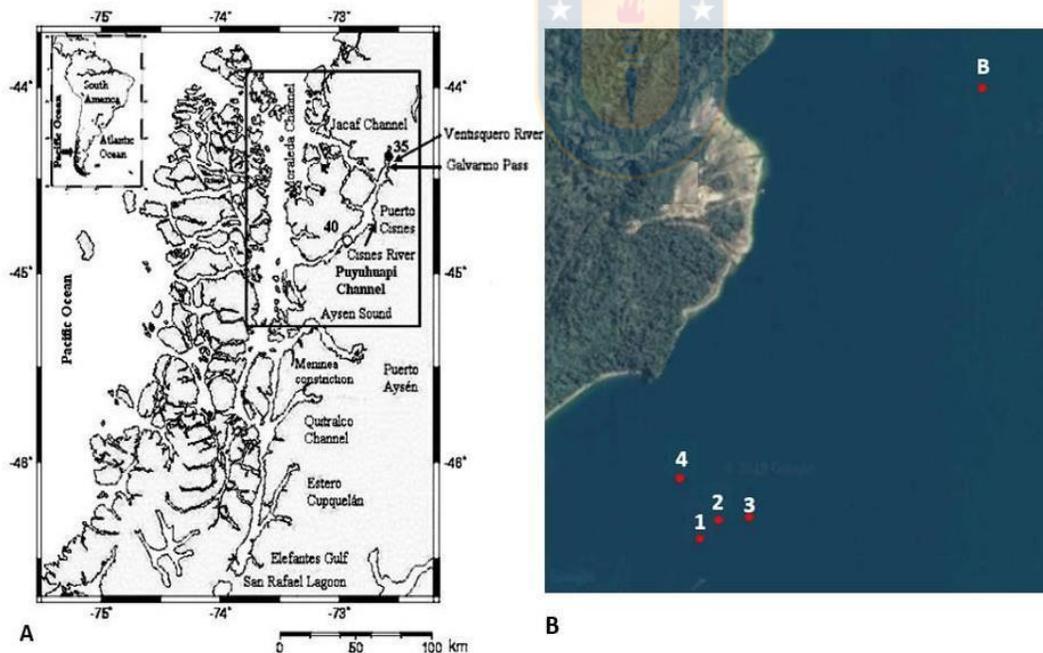


Figura 1: (A): Ubicación geográfica de la zona de muestreo que corresponde al canal Puyuhuapi, Región de Aysén (Rebolledo *et al.*, 2005). (B) Localización de las estaciones de muestreo, donde 1: Estación 1, 2: Estación 2, 3: Estación 3, 4: Estación 4 y B: Boya (control) Fuente: Elaboración propia.

2.2. Recuento bacteriano en muestras de agua y sedimento.

El recuento bacteriano total y la proporción de bacterias vivas y muertas se realizó por microscopía de epifluorescencia (Lebaron *et al.*, 1994). Alícuotas de 3 mL de agua fueron filtradas utilizando filtros de policarbonato negro de 0,2 μm poro, con el fin de concentrar las bacterias presentes en la muestra. Las bacterias retenidas en los filtros fueron teñidas con el kit *BacLight Viability* (Molecular Probes, Eugene, USA), para lo cual, se adicionó 1 mL de agua destilada estéril que contenía 1 μl de la tinción Live/Dead, la cual consta de dos componentes: yoduro de propidio, con el cual las células con membrana dañada se visualizan de color rojo; y SYTO 9, con el cual las células con membrana íntegra emiten fluorescencia y se visualizan de color verde, se incubó en oscuridad a temperatura ambiente (25 C) por 7 min para luego ser filtrados. Los recuentos fueron realizados por triplicado, y se observaron al azar 10 campos usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiostar, con una lámpara de mercurio HBO 50, lo que permitió calcular el promedio de bacterias vivas y muertas para cada muestra.

Finalmente, se determinó el recuento bacteriano para cada estación considerando el promedio de los resultados obtenidos para cada profundidad muestreada.

2.3. Determinación de la estructura comunitaria y genes de resistencia de las comunidades bacterianas en las muestras de agua.

2.3.1 Extracción de ADN y ARN.

Alícuotas de 1 L de agua fueron filtradas utilizando filtros de ésteres de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro, con el fin de concentrar las bacterias presentes en la muestra. Este filtro fue almacenado a -20 C para su posterior análisis. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción *UltraClean soil DNA* (MO BIO Laboratorios, Inc., USA), de acuerdo a las instrucciones descrita en el protocolo informado por los fabricantes.

La extracción de ARN se realizó a partir de filtros de ésteres de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro preservados con RNA later, a través de los cuales previamente se filtró 1,5 L de agua. Se utilizó el kit *UltraClean microbial RNA Isolation kit sample* (MO BIO

Laboratorios, Inc., USA), según el protocolo informado por los fabricantes.

2.3.2. *Determinación de la estructura de la comunidad bacteriana en las muestras de agua.*

i. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN obtenido de las muestras de agua, se amplificó fragmentos intragénicos del gen que codifica el ARNr 16S usando los partidores 907R/341F (Muyzer y Smalla, 1998), para luego realizar un Nested-PCR con los partidores 534R y 341F (Muyzer *et al.*, 1993) unido a un GC-clamp.

ii. Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), usando el sistema *DCode System Bio-Rad Laboratories* (USA) (Ferris *et al.* 1996). Se utilizaron geles de acrilamida al 8% con un gradiente urea/formamida entre 20 y 70% (Fromin *et al.* 2002). La electroforesis vertical se realizó a 60°C por 16 h a 60 V en una solución con búfer TAE 1x. Los geles obtenidos fueron teñidos usando *SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain* (ThermoFisher Scientific, USA) según indicaciones del fabricante. Las imágenes de los geles fueron procesadas utilizando el software *GelPro Analyzer* (Versión 6.3 Media Cybernetic), para estimar el número de bandas resultantes de la electroforesis, además de realizar los análisis de riqueza de especies y patrones comunitarios. Para observar la relación de las comunidades presentes en los diversos sitios de muestreo se realizó un Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) utilizando el software IBM SPSS Statistic versión 23.0 (SPSS Inc[®], Chicago, IL)

2.3.3. *Determinación de la presencia de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua.*

La pesquisa de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol se realizó mediante PCR convencional, con partidores diseñados en este estudio e indicados en la tabla 1, para

pesquisa de los genes: *floR*, *fexA*, *cfr* (resistencia a florfenicol) y *tetO*, *tetC*, *tet34*, *otrA* y *otrB* (resistencia a tetraciclina).

2.3.4. Determinación de los niveles de expresión relativos de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua.

La cuantificación relativa de los genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol se realizó mediante RT-PCR. Para lo cual, se trabajó con la extracción de ARN total, previamente descrita en el punto 3.1. y posteriormente tratado con DNase I (RNase free) (ThermoFisher Scientific, USA) de acuerdo a las instrucciones descrita en el protocolo informado por los fabricantes, esto con el fin de eliminar restos de ADN presentes en la muestra, lo que se verificó realizando un PCR para el gen ADNr16S utilizando los partidores *rrs1* 5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC C-3') y *rrs2* (5'-TCG TTG CGG GAC TTA ACC CAA C-3') (Van de Klundert y Vliegenthart 1993).

La síntesis de ADNc fue realizado utilizando el kit RevertAid First strand cDNA (ThermoFisher Scientific, USA) de acuerdo a las instrucciones descrita en el protocolo informado por los fabricantes.

Utilizando el ADNc como templado, se realizó un PCR de 15 ciclos para la amplificación del ADNr 16S, y de 25 ciclos para la amplificación de los diferentes genes de resistencia (Lopes *et al.*, 2012), se utilizaron los partidores diseñados en este estudio (Tabla 1) que permiten la pesquisa de oxitetraciclina (*tetO*, *tetC*, *tet34*, *otrA* y *otrB*) y florfenicol (*floR*, *fexA*, *cfr*). En caso de no detectarse amplificación de los genes de resistencia, se realizó un PCR convencional (30 ciclos) con los mismos partidores empleados anteriormente, para descartar la presencia de los genes de resistencia pesquisados.

Tabla 1: Listado de partidores empleados para la detección y cuantificación de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol (diseñados en este estudio).

Antibiótico	Gen	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)
Florfenicol	<i>floR</i>	GGCGACGGCCAATTCTACTT	200
		AAGGCCGTAGATGACGACAC	
	<i>cfr</i>	GTGAAGCTCTAGCCAACCGT	200
		CAATTTGCTGCGTTCCTCACT	
	<i>fexA</i>	CTTCTGGACAGGCTGGAATGA	200
		GAGGACCCCCACGGAAACTA	
Oxitetraciclina	<i>otrB</i>	GCTCCGCGGTCAACTTCA	200
		GATCGCCAGTTTCTTGAACCG	
	<i>tet34</i>	GCAATCAGTTTCGCTTTCGGG	200
		ATTCTTGCGCGTGAACCTTGG	
	<i>tetC</i>	TGCCTACATCACAACAAAACCTGAT	200
		TGCTGACAATGGCGTTTACCT	
	<i>tetO</i>	AGCGGAACATTGCATTTGAGG	200
		AATTTTCTCTGCGGCAACAGC	
	<i>otrA</i>	GAACACGTACTGACCGAGAAG	200
		CAGAAGTAGTTGTGCGTCCG	

2. 4. Aislamiento, identificación y determinación fenotípica y genotípica de los perfiles de resistencia de los aislados cultivables heterotróficos aeróbicos.

A partir de las muestras se filtró 0,5 L de agua utilizando filtros de ésteres de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro, con el fin de concentrar las bacterias presentes en la muestra. Esto se realizó por duplicado, para depositar un set de filtros sobre la superficie de agar marino y otro sobre la superficie de agar R₂A, ambos suplementados con cicloheximida en una concentración final por placa de 50 µg/mL para evitar el crecimiento de hongos. Esto con el fin de suplir las posibles diferencias en cuanto a requerimientos nutricionales de las

bacterias que se encuentran en el canal Puyuhuapi.

Estas placas fueron incubadas por cinco días a 15°C. Las colonias obtenidas fueron sembradas mediante la técnica de siembra por agotamiento con el fin de obtener colonias aisladas. Se determinó la presencia de 58 morfotipos diferentes, los que fueron almacenados a -80°C, en criotubos que contienen una mezcla de caldo glicerol (50% v/v) en proporción 2:1.

2.4.1. Aislamiento de bacterias heterotróficas aeróbicas resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.

Los 58 morfotipos aislados previamente, fueron sembrados paralelamente en placas de agar marino y R₂A, ambas suplementadas con tetraciclina (5 µg/mL) o florfenicol (3 µg/mL), concentraciones que corresponden a la mitad de la concentración considerada como punto de corte que define resistencia a estos antibióticos en patógenos veterinarios (CLSI, 2002). Estas placas se incubaron por cinco días a 15°C y se seleccionaron las colonias con morfotipo diferente.

2.4.2. Identificación de los aislados resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.

Para realizar la identificación de los diferentes morfotipos seleccionados, se extrajo ADN mediante ebullición (Dashti *et al.*, 2009), y éste se usó como templado para amplificar una fracción intragénica del gen codificante del ARNr16S, utilizando los partidores P0/P6 (Ventura *et al.*, 2001). Posteriormente, los productos de la amplificación se secuenciaron mediante reacción Sanger en la empresa MacroGen[®] Inc., Corea.

2.4.3. Susceptibilidad de los aislados a los antibióticos

Los perfiles de resistencia de los aislados se determinaron mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966), por difusión en agar, con modificaciones, reemplazando el agar Mueller-Hinton por agar tripticasa suplementado con 2% de NaCl. Los antibióticos ensayados corresponden a: flumequina (30 µg), florfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg),

kanamicina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefotaxima (30 µg) y ceftioxime (30 µg). Se utilizó como control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se consideró como punto de corte para definir resistencia un halo de inhibición ≤ 14 mm, por esta razón los aislados con halos ≤ 14 mm, fueron considerados resistentes y los con halos de inhibición > 14 mm se consideraron susceptibles (Cigarroa, 2016).

2.4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tetraciclina y florfenicol.

La determinación de la CMI se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), por dilución seriada en agar; con las siguientes modificaciones: el agar Mueller-Hinton fue reemplazado por agar tripticasa suplementado con 2% de NaCl, de manera de cumplir con los requerimientos metabólicos de los aislados bacterianos. Se utilizó como control *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las placas fueron incubadas por 24 h a 15 C.

2.4.5. Pesquisa de genes de resistencia a oxitetraciclina, florfenicol e integrones de clase 1 y 2.

A partir de los aislados cultivables se realizó extracción de ADN, para pesquisar genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol, con los partidores mencionados en la tabla 1. Adicionalmente, se investigó también la presencia de algunas plataformas móviles como integrones clase 1 y 2, con los partidores HS915/HS916 (Márquez *et al.*, 2008) y IntI2R/IntI2F (Cicek *et al.*, 2013), respectivamente.

A los aislados cultivables portadores de integrones clase 1 se les amplificó la zona variable utilizando los partidores CASS1/CAS2 (Rosser y Young, 1999). Posteriormente, los productos de la amplificación se secuenciaron mediante reacción Sanger en la empresa MacroGen[®] Inc., Corea, con el fin de identificar los genes presentes en la zona variable del integrón.

3. RESULTADOS

3.1. Recuento bacteriano en muestras de agua y sedimento.

El recuento de bacterias totales, además de aquellas con membrana íntegra (vivas) y membrana dañada (muertas), evidencian un patrón de distribución relativamente similar entre los puntos de muestreo, observándose en todas las muestras un recuento bacteriano en el rango de 10^6 bacterias/mL, tal como muestra la figura 2. Por otra parte, fue posible determinar que la proporción entre bacterias vivas y muertas (4:1 respectivamente) es la misma en todas las estaciones de muestreo.

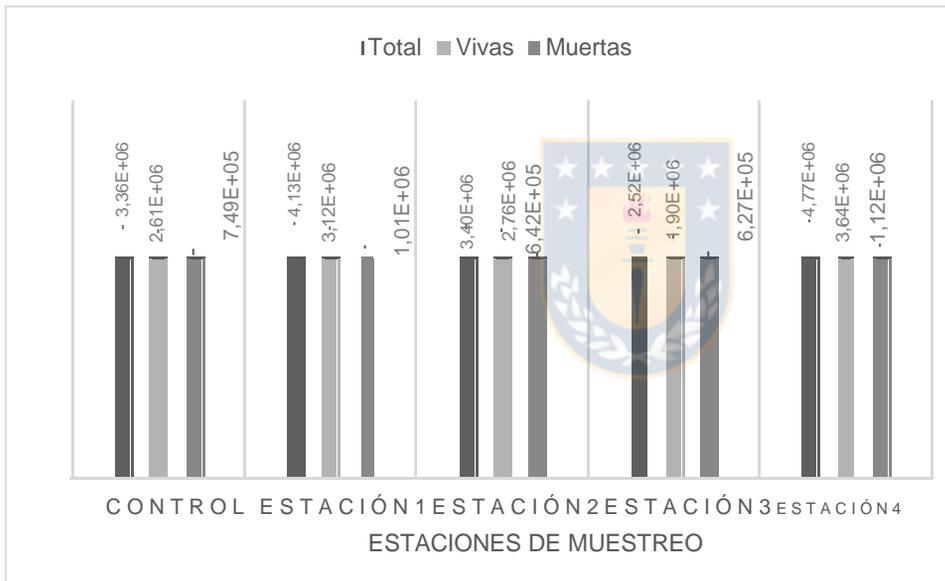


Figura 2: Recuento bacteriano total, vivas y muertas, según el criterio de integridad de membrana, en cada punto de muestreo, considerando el promedio de las tres profundidades muestreadas en cada estación. Fuente: Elaboración propia.

3.2. Estructura comunitaria y perfil de genes de resistencia de las comunidades bacterianas presentes en la columna de agua.

3.2.1 Patrones de diversidad bacteriana en la columna de agua.

Los resultados de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) que se muestra en la figura 3 evidenciaron que las estaciones de muestreo a diferentes distancias

de las balsas jaulas, tienen una riqueza de especies similar entre ellas, observándose un promedio de 20 OTUs para las cuatro estaciones de muestreo, y de 24 OTUs para la estación control (boya), tal como muestra la tabla 2.

Tabla 2: Número de OTUs observados en cada muestra de agua analizada. Fuente: Elaboración propia.

Estaciones y Profundidad	2 m	15 m	50 m	Promedio
Boya	21	22	28	24
Estación 1	22	19	22	21
Estación 2	20	20	20	20
Estación 3	21	17	22	20
Estación 4	21	17	21	20

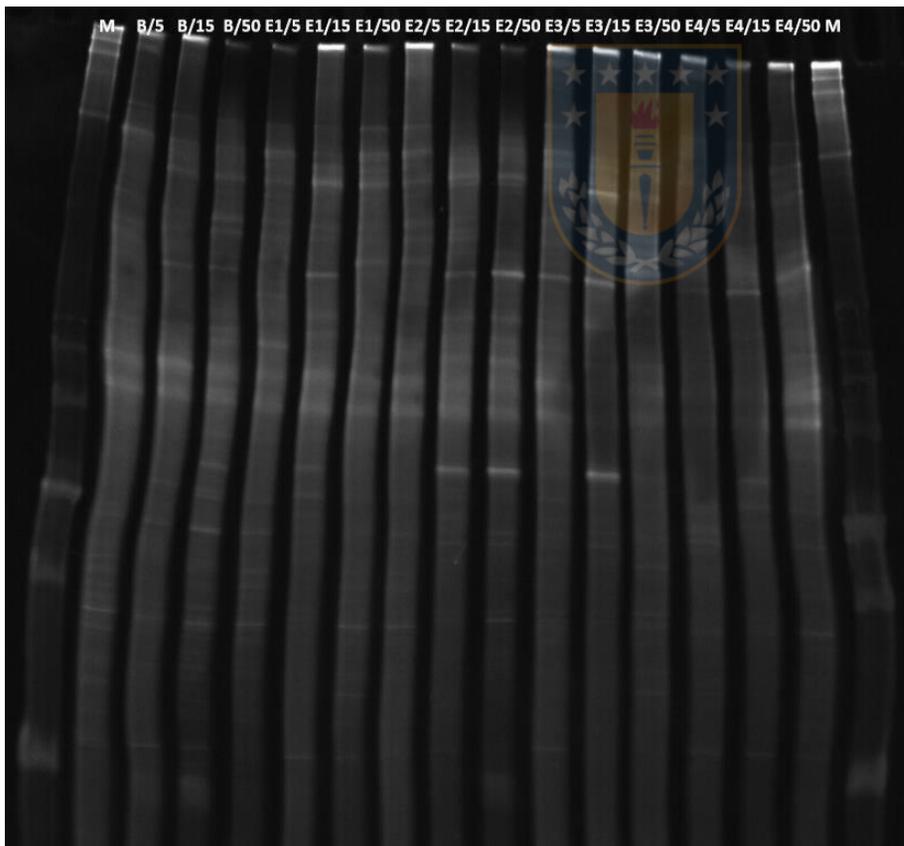


Figura 3: Resultado de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) realizado a las muestras de agua, donde M es el marcador de tamaño molecular (100pb), B/5: Boya profundidad 5m, B/15: Boya profundidad 15m, B/50: Bota profundidad 50m, E1/5:

Estación 1 profundidad 5m, E1/15: Estación 1 profundidad 15m, E1/50: Estación 1 profundidad 50m, E2/5: Estación 2 profundidad 5m, E2/15: Estación 2 profundidad 15m, E2/50: Estación 2 profundidad 50m, E3/5: Estación 3 profundidad 5m, E3/15: Estación 3 profundidad 15m, E3/50: Estación 3 profundidad 50m, E4/5: Estación 4 profundidad 5m, E4/15: Estación 4 profundidad 15m, E4/50: Estación 4 profundidad 50m. Fuente: Elaboración propia.

La composición de las comunidades bacterianas del fiordo Puyuhuapi, fue analizada mediante un NMDS, que permite evaluar la similitud de la composición de las comunidades bacteriana en base al análisis de similitud por el coeficiente de distancia Bray-Curtis. En la figura 4 se muestra, por ejemplo, que las comunidades bacterianas de las estaciones 1 y 2 comparten un 73% de similitud.

Si se realiza el mismo análisis considerando la profundidad (figura 5) se puede observar que la similitud de la composición de la comunidad bacteriana es similar para las tres primeras estaciones de muestreo, en la capa superficial (figura 5a) y profunda (figura 5b), no así en la zona de mezcla (15m).

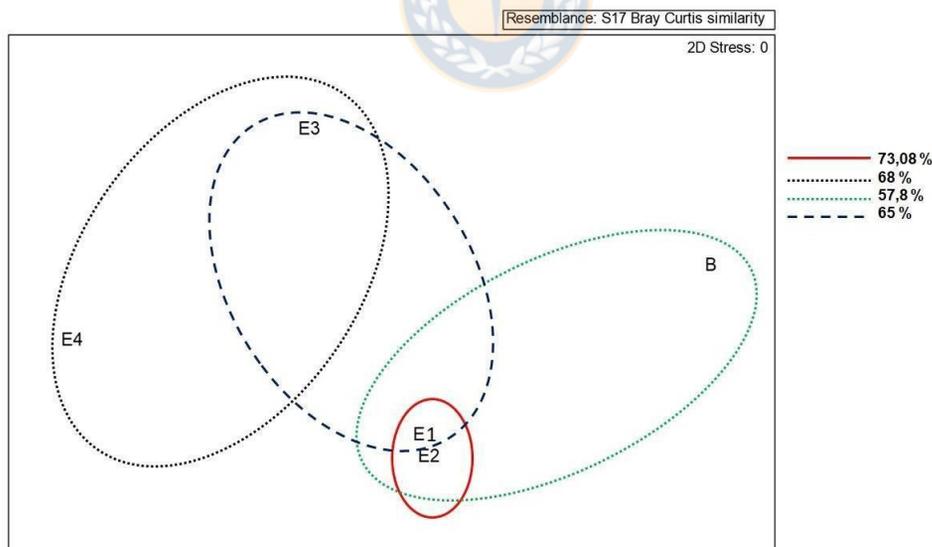


Figura 4: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi, considerando todas las profundidades para cada estación. E: Estación 1, E2: Estación 2, E.: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. Fuente: Elaboración propia.

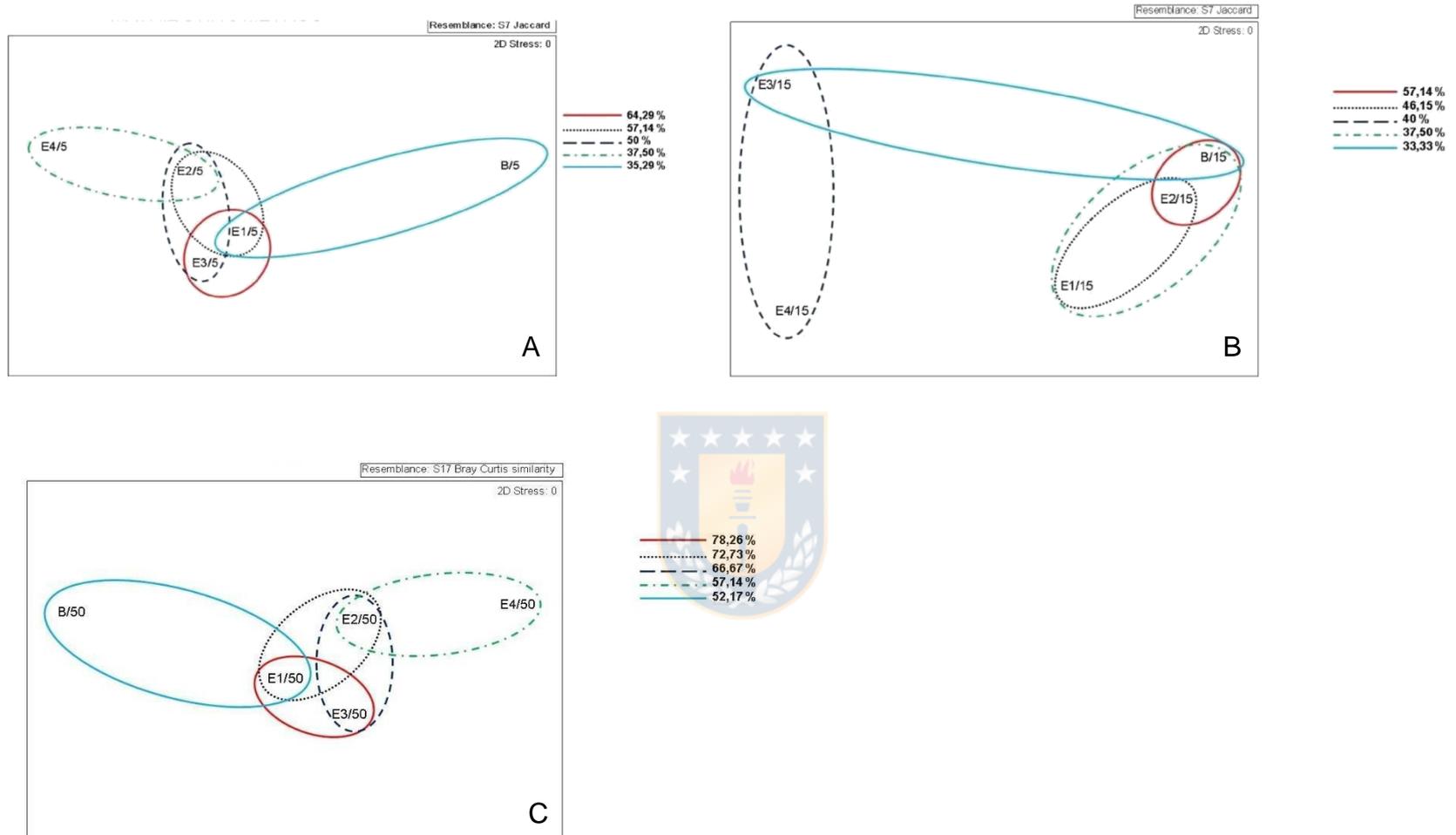


Figura 5: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi en profundidad de 2 m (A), 50 m (B) y 100 m (C). E1: Estación 1, E2: Estación 2, E.: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. Fuente: Elaboración propia.

3.2.2 Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol en muestras de agua.

En el caso de las muestras de ADN, el total de genes de resistencia pesquisados se muestra en la tabla 3. En las muestras de agua se observa que la resistencia a florfenicol esta principalmente determinada por el gen *floR*, mientras que la resistencia a oxitetraciclina está mediada por cinco genes (*tetO*, *tetC*, *tet34*, *otrA* y *otrB*) que presentan distribución más homogénea. Sin embargo, al analizar estos datos mediante un NMDS, no se observa un patrón de influencia de las balsas jaulas sobre la abundancia de los genes de resistencia pesquisados (figura 6).

En el caso del RT-PCR realizado, no se observó la expresión de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol (figura 7), lo que estaría evidenciando que, en el momento de la toma de muestra, ninguno de los genes pesquisados estaba siendo expresado por la comunidad bacteriana, o que su expresión estaba por debajo del límite de detección del método empleado.



Tabla 3: Presencia de genes de resistencia a florfenicol y oxitetraciclina en el ADN extraído de muestras de agua de las diferentes estaciones a diferentes profundidades. Fuente: Elaboración propia.

Estaciones	Genes que codifican resistencia a:							
	florfenicol			oxitetraciclina				
	<i>floR</i>	<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	<i>tetO</i>	<i>tetC</i>	<i>tet34</i>	<i>otrA</i>	<i>otrB</i>
2 m								
Boya	+		+	+		+	+	
Estación 1	+				+			+
Estación 2	+							+
Estación 3			+					
Estación 4	+			+		+		
15 m								
Boya	+							+
Estación 1	+			+	+	+	+	
Estación 2	+							
Estación 3	+			+	+	+	+	
Estación 4	+			+		+		
50 m								
Boya	+					+	+	
Estación 1	+		+		+	+		
Estación 2	+			+	+			
Estación 3	+							+
Estación 4	+							
Total	14	0	3	6	5	7	4	4

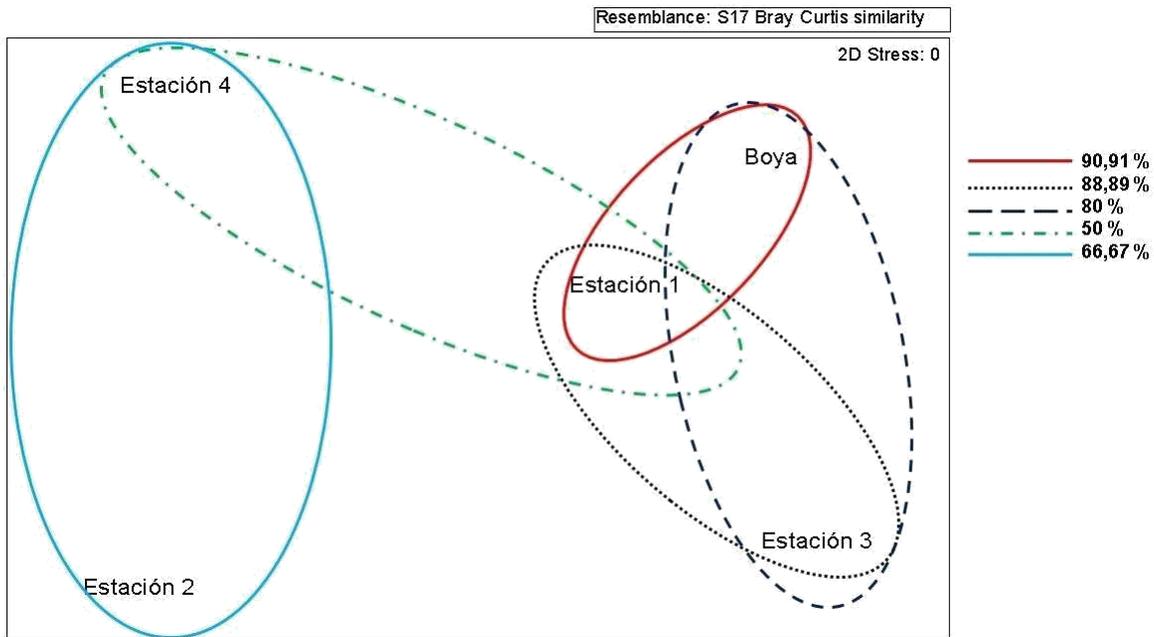


Figura 6: Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los resultados obtenidos para la presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol presentes en las muestras de ADN de la comunidad bacteriana de agua del fiordo Puyuhuapi. E: Estación 1, E2: Estación 2, E.: Estación 3, E4: Estación 4 y B: Estación boya, utilizada como control. Fuente: Elaboración propia.

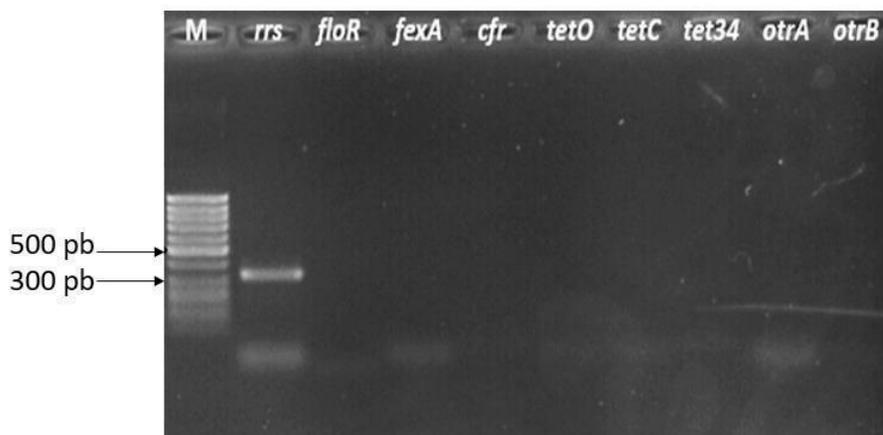


Figura 7: Gel de agarosa al 1% que muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la pesquisa de genes de resistencia en el cDNA. M: Marcador de tamaño molecular, *rrs*: control para ADNr16S de 320pb. Fuente: Elaboración propia.

3.3 Identificación y determinación fenotípica y genotípica de los perfiles de resistencia de los aislados cultivables heterotróficos aeróbicos.

3.3.1 Identificación de los aislados resistentes a oxitetraciclina o florfenicol.

De las muestras de agua del canal Puyuhuapi se aislaron 58 morfotipos diferentes, de los cuales seis crecieron en las placas suplementadas con antibióticos (5 µg/mL de tetraciclina o 3 µg/mL de florfenicol). Las especies identificadas se encuentran en la tabla 4.

Tabla 4: Identificación de aislados bacterianos recuperados de muestras de agua del fiordo Puyuhuapi, en placas de agar con oxitetraciclina o florfenicol. Fuente: Elaboración propia.

Estación	Profundidad (m)	Resultado de búsqueda BLAST más cercano	Identidad máxima (%)	Código de acceso GenBank
	5	<i>Pseudomonas fragi</i>	99,32	NRRLB-727(T)
Estación 2	20	<i>Pseudoalteromonas neustonica</i>	98,32	PAMC 28425(T)
	20	<i>Aliivibrio sifiae</i>	97,83	H1-1(T)
Estación 3	5	<i>Shewanella baltica</i>	97,87	NCTC 10735(T)
	15	<i>Providencia burhodogranariaea</i>	97,55	DSM 19968(T)
	15	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	97,74	LMG 21574(T)

3.3.2 Susceptibilidad de los aislados a los antibióticos

Los perfiles de susceptibilidad de los aislados resistentes a oxitetraciclina o florfenicol se muestran en la tabla 5, donde los resultados muestran que las cepas tienen un perfil de resistencia reducido principalmente a uno, o ambos, antibióticos de mayor uso en salmonicultura.

Tabla 5: Comportamiento a varios antibióticos de las cepas aisladas desde muestras de agua del fiordo Puyuhuapi. Fuente: Elaboración propia.

Cepa	FLU	KAN	TET	FFC	CTX	AMP	FOX
<i>Pseudoalteromonas</i>							
<i>neustonica</i>	S	S	R	R	S	S	S
<i>Shewanella baltica</i>	S	S	R	R	S	S	S
<i>Providencia</i>							
<i>burhodogranariea</i>	R	R	S	R	S	S	S
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	S	S	S	R	S	S	S
<i>Aliivibrio sifiae</i>	S	S	R	S	S	S	S
<i>Pseudomonas fragi</i>	S	S	S	R	S	R	R

FLU: flumequina, KAN: kanamicina, TET: tetraciclina, FFC: florfenicol, CTX: cefotaxima, AMP: ampicilina, FOX: ceftioxitina, S: Susceptible, R: Resistente.

3.3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tetraciclina y florfenicol.

Los rangos de concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas recuperadas en placas con oxitetraciclina o florfenicol, van desde 0,125 µg/mL a 64 µg/mL, siendo *Providencia burhodogranariea* quien mostró el valor más alto para ambos compuestos.

Tabla 6: CMI₅₀, CMI₉₀ y media geométrica CMI, para las cepas incluidas en el estudio.

Fuente: Elaboración propia.

Antibiótico	CMI* ₅₀	CMI* ₉₀	MG _{CMI*}
Cloranfenicol	0,125	64	1,641
Tetraciclina	0,125	64	1,104

*: µg/mL; MG: media geométrica

3.3.4. Pesquisa de genes de resistencia a oxitetraciclina, florfenicol e integrones de clase 1 y 2.

En cuatro cepas fue posible amplificar un fragmento intragénico del gen *intl1*, de las cuales *P. burhodogranariea* y *A. sifiae* no presentaban genes de resistencia en la zona variable; sin embargo, *V. tasmaniensis* y *P. fragi* presentaron el gen de resistencia a aminoglucósidos *aadA9*, que codifica para una enzima adenililtransferasa que modifica los aminoglicósidos estreptomicina y spectinomicina.

Respecto de los genes de resistencia a florfenicol, *floR* fue el que se encontró en mayor número de cepas, ya que se amplificó en todos los aislados y es el que otorga resistencia a florfenicol y cloranfenicol mediante una bomba de expulsión. En cambio, la resistencia a tetraciclina está mediada principalmente por los genes *tetC* y *tetO* como se observa en la tabla 7.

Tabla 7: Presencia de genes de resistencia a oxitetraciclina y florfenicol pesquisados en los aislados recuperados en placas de agar marino con oxitetraciclina o florfenicol. Fuente: Elaboración propia.

Especie	<i>floR</i>	<i>fexA</i>	<i>cfr</i>	<i>tetO</i>	<i>tetC</i>	<i>tet34</i>	<i>otrA</i>	<i>otrB</i>
<i>Pseudoalteromonas neustonica</i>	+						+	
<i>Aliivibrio sifiae</i>	+				+			
<i>Shewanella baltica</i>	+				+			
<i>Providencia burhodogranariea</i>	+			+				
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	+							+
<i>Pseudomonas fragi</i>	+		+	+				

4. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis contribuye a la información ya recabada respecto de los posibles efectos de la actividad salmonícola, particularmente en el fiordo Puyuhuapi, Región de Aysén, donde los resultados obtenidos en cuanto a la abundancia de bacterias a diferentes distancias de los centros, mostraron que el recuento bacteriano de las muestras del fiordo Puyuhuapi evidencia una relación constante entre bacterias vivas y muertas (4:1, respectivamente en todas las estaciones muestreadas, incluida la estación control, lo que podría indicar que la industria salmonera no estaría influenciando la cantidad de bacterias presentes en el entorno directo. La abundancia de bacterias también se mantiene constante en todas las estaciones muestreadas, incluida la estación control, evidenciándose una leve tendencia de disminución en el recuento total a medida que las estaciones de muestreo se alejan de las balsas jaulas; sin embargo, al considerar la estación 4, que es el punto de muestreo más lejano a los centros de cultivo (aproximadamente a 250 m), este patrón de disminución no se observó. Estos resultados sugieren que la actividad salmonícola no tendría un marcado efecto sobre la abundancia bacteriana (aumentándola o disminuyéndola). En contraste, los resultados obtenidos por la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), muestran diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana entre las diferentes estaciones muestreadas. Estas variaciones permiten agrupar mediante un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), a las estaciones 1 y 2, que tienen una similitud de un 73% y que son las estaciones más cercanas al centro de cultivo de salmónes, y la similitud de estas estaciones con las otras muestreadas varía entre 68 y 57%.

Al observar este mismo análisis para cada profundidad de muestreo (figura 5), fue posible observar que en la capa superficial y profunda del fiordo se observa una alta similitud entre las primeras tres estaciones que se encuentran en un radio de 118 m desde las balsas jaulas, y hay una menor similitud con la estación 4 que se encuentra alejada 250 m del centro de cultivo. Esto sugiere que en el entorno directo al centro (aproximadamente 100 m) la estructura de las comunidades bacterianas es diferente, sin disminuir la riqueza de especies. Aunque son necesarios más estudios para poder determinar cómo los cambios en la composición de las comunidades bacterianas, podrían tener un efecto en el

funcionamiento del ambiente en estudio, se ha descrito anteriormente, que los microorganismos tienen un rol principal en la transformación de nutrientes, el funcionamiento del ecosistema podría verse afectado, ya que, por ejemplo, si se pierde un grupo funcional de microorganismos que oxida nitrógeno, indudablemente el ciclo del nitrógeno se vería afectado. Sin embargo, aunque los estudios realizados muestran que cambios en la composición de los grupos funcionales de microorganismos están relacionados con los cambios en los procesos del ecosistema, no se ha demostrado una relación causal entre ambos, debido a las dificultades que existen al estudiar la estrecha relación que existe entre la composición de la comunidad bacteriana, las variables ambientales y procesos del ecosistema (Reed y Martiny, 2007). Con todo, se debe considerar que las variaciones en la composición de las comunidades bacterianas del canal Puyuhuapi se ven modificadas por diversos factores, tales como; i) el aumento en la temperatura de agua, que produce una gran disminución de la riqueza de OTUs, ii) abundancia de diatomeas y dinoflagelados, que favorece la abundancia de grupos bacterianos especializados que degradan eficientemente el detritus del fitoplancton (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Otro factor relevante dentro de la industria acuícola es la alta utilización de antibióticos, ya que el uso de estos compuestos favorece la selección y emergencia de bacterias resistentes. La información obtenida en este estudio podría indicar que no existe un gradiente de influencia desde el centro de cultivo en el número de genes de resistencia pesquisados. Esto indicaría que si bien existe diseminación de genes de resistencia, esta no tendría una disminución en abundancia respecto de los puntos más cercanos al centro de cultivo, por lo que no se observa un gradiente de influencia desde dicho centro. Además, analizando la resistencia para los dos antibióticos pesquisados, se observa que la resistencia a oxitetraciclina no está mediada por un gen en particular, ya que se pesquisó la presencia cinco genes (*otrA*, *otrB*, *tetC*, *tet34* y *tetO*). En cambio, en el caso de florfenicol se observó predominancia del gen *floR*, el cual se encontró en 14 de las 15 muestras analizadas (93%). Esto se condice con la alta utilización de este antibiótico en el año de muestreo, que a nivel nacional fue de 451,3 toneladas, representando el 81% del total de antibióticos utilizados (SERNAPESCA, 2016). El gen *floR* codifica para una bomba de expulsión compuesta por una sola proteína que atraviesa la membrana citoplasmática y

puede mover compuestos mediante diferentes sistemas de transporte: uniporte, simporte y antiporte (Paulsen *et al.*, 1996), el cual se encuentra principalmente localizado en integrones y plásmidos (Arcangioli *et al.*, 1999 y Keyes *et al.*, 2000), cuya transferibilidad podría conducir a una alta diseminación en el ambiente marino.

Pese a la importante presencia de genes de resistencia encontrada en los extractos de ADN total de las muestras de agua del fiordo Puyuhuapi, los resultados del RT-PCR fueron negativos para todos los genes pesquisados, lo que permite concluir que si bien existen genes de resistencia a antibióticos en las muestras analizadas, estos no se estarían expresando, al menos en el momento del muestreo, lo que podría deberse a los genes de resistencia a antibióticos pueden encontrarse en agua y sedimentos de ambientes marinos asociados a centros de cultivo de salmones, inclusive en periodos donde se encuentran sin tratamiento antibiótico, es decir, sin presión selectiva para dichos genes (Miranda *et al.*, 2018) y por lo tanto, sin la necesidad de expresarse. Esto podría indicar que el fiordo estaría actuando como un reservorio de genes de resistencia a antibióticos de uso en salmonicultura los cuáles no necesariamente están siendo expresados. Si a esto se añade que los ambientes marinos actúan como destino final de aguas provenientes de diversas fuentes, tales como las aguas provenientes de plantas de tratamientos de aguas servidas, desagüe de hospitales y escorrentía agrícola (Baquero *et al.*, 2008) que portan bacterias con genes de resistencia, favorecerían, en su conjunto, a la alta incidencia de bacterias multiresistentes a antibióticos en aguas (Miranda y Zemelman, 2002b; Miranda y Rojas, 2007; Buschmann *et al.*, 2012). Aunque en esta tesis, se obtuvo un bajo número de aislados desde las muestras sembradas en placas de agar marino con presión selectiva (oxitetraciclina o florfenicol), Deben considerarse dos factores : i) el número de unidades taxonómicas operacionales para cada estación fluctuaba entre 20 y 23, por lo cual, seis aislados resistentes corresponderían aproximadamente al 30% de las OTUs de cada estación y al 5,8% de las OTUs totales, ii) se estima que sólo el 1 – 10% de las bacterias presentes en una muestra pueden cultivarse mediante la técnica de cultivo en placas de agar (Pepper y Gerba, 2015). No obstante, de las seis cepas recuperadas, todas presentaron resistencia a al menos uno de los antibióticos ensayados mediante antibiograma, siendo la resistencia a florfenicol la más abundante, presente en los siete aislados, lo que concuerda con la abundancia del gen *floR* en las muestras de agua, y que

había sido previamente descrita en el estudio realizado por Fernández-Alarcón *et al.*, (2010). Es este estudio se informa que el 21,8% de los aislados provenientes de siete diferentes centros cultivos de salmón en agua dulce, mostraron la presencia de este gen. En cambio, la resistencia a oxitetraciclina se evidenció en sólo tres cepas. Las medias geométricas de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) resultaron similares para ambos antibióticos, lo que indica que independiente de que un mayor número de cepas muestren resistencia a florfenicol, la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano es muy similar para tetraciclina y florfenicol (MG_{CMI} 1,1 µg/mL y 1,6 µg/mL, respectivamente), lo que en ambos casos, según el CLSI (2002) está por debajo de la punto de corte establecido para ambos antibióticos, que en el caso del florfenicol es ≥ 8 µg/mL y de la tetraciclina es ≥ 16 µg/mL. Sin embargo, pese a la baja concentración de antibióticos que se requiere para inhibir el crecimiento bacteriano, estos aislados portadores de genes de resistencia para ambos antibióticos, podrían representar un riesgo de diseminación de estos genes a otras bacterias del ambiente marino e incluso al ambiente hospitalario, pese a que, hasta el momento, sólo haya dos estudios que demuestran la movilidad de los genes de resistencia detectados en salmicultura, donde se ha demostrado la capacidad de transferir genes *tet* a *E. coli* (Miranda *et al.* 2003; Roberts *et al.* 2015). Esto sugiere que la salmicultura podría ser muy importante en el enriquecimiento del resistoma ambiental, y que presenta las características necesarias para diseminar esta resistencia en bacterias entéricas, las que podrían jugar un rol importante en las enfermedades humanas transmitidas por agua contaminada (Miranda *et al.*, 2018). Sin embargo, se debe considerar que el ambiente marino se ve expuesto constantemente a la incorporación de bacterias resistentes, lo que ocurre principalmente mediante tres mecanismos: i) selección de bacterias resistentes en respuesta a la producción de antibióticos en forma natural, ii) a través del agua de escorrentía proveniente de fuentes terrestres, en cuyo caso se espera encontrar los genes de resistencia en taxa de origen distinto al ambiente marino, y finalmente, iii) a través de la selección de bacterias resistentes debido a la incorporación de antibióticos producto de la actividad antropogénica, que favorece la selección y proliferación de bacterias resistentes (Hatosy y Martiny, 2015). Este último mecanismo es altamente relevante en ambientes intervenidos por diversas actividades acuícolas, los cuales se ven expuestos a la incorporación de antibióticos tanto en la columna de agua como en los

sedimentos marinos. Por ejemplo, en Chile la salmonicultura ha pasado de utilizar 143,2 toneladas en 2010 a 382,5 toneladas en 2016 (SERNAPESCA, 2017b). Esta gran incorporación de antibióticos podría favorecer la selección de bacterias que portan genes de resistencia a estos compuestos. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que los océanos corresponden a “sistemas de dilución” por lo que los compuestos que se incorporan a él pueden difundir rápidamente desde la fuente de origen (Higuera-Llantén *et al.*, 2018), lo que contribuiría, por ejemplo, a la diseminación de los antibióticos utilizados por la industria salmonera.

De acuerdo a Miranda *et al.*, (2018) en Chile se han realizado hasta la fecha once trabajos enfocados en el estudio de bacterias resistentes de ambientes marinos y de agua dulce, lo que evidencia en alguna medida la falta de información respecto a las implicancias de la acuicultura, una de las actividades económicas más relevantes del país. No obstante, algunos estudios realizados en la fase de cultivo en agua dulce, donde el antibiótico de mayor utilización es oxitetraciclina (86,8% del total de antibióticos utilizados) (SERNAPESCA, 2017b) han encontrado una elevada presencia de bacterias resistentes a este antibiótico mediada por la presencia de una bomba de expulsión codificada en el gen *tet* (Miranda y Zemelman, 2002a, b; Miranda *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2015). Por otra parte, Miranda y Zemelman (2002a), analizaron 103 cepas bacterianas aisladas de diferentes fuentes de cultivo de salmones en agua dulce, donde encontraron una alta predominancia de *Pseudomonas* spp. multidrogo resistentes, además de 74 aislados que mostraron resistencia a entre 6 y 10 antibióticos, entre los cuales se encuentran: amoxicilina, eritromicina, furazolidona, florfenicol, cefotaxima y trimetoprim-sulfametoxazol. En otro estudio, Miranda y Rojas (2007), compararon la abundancia de bacterias resistentes a florfenicol en centros de cultivo con diferentes historiales de uso de antibióticos, ubicados en dos lagos diferentes, e informan un 26,4% de resistencia a florfenicol en sedimento bajo las balsas jaulas en el centro con historial reciente de uso de este antibiótico, mientras que en centro donde no se había utilizado terapia con florfenicol de forma reciente, el porcentaje de bacterias resistentes alcanzaba tan sólo a 0,69%. Empero, estos resultados deben ser tomados con cautela, ya que sedimentos utilizados como control, es decir, provenientes de un lago donde no hay centros de cultivos de salmones, igualmente mostraron elevados niveles de bacterias resistentes (18,6%), con una alta predominancia de *Pseudomonas*

spp., lo que podría explicar el resultado obtenido, ya que este género muestra insusceptibilidad natural a múltiples antibióticos.

En el caso de los estudios de resistencia a antibióticos realizados en la fase de cultivo en el ambiente marino, se ha encontrado una alta incidencia de genes de resistencia a sulfonamidas y trimetoprim (*sul* y *dfrA*, respectivamente), además de la presencia de elementos genéticos móviles como integrones de clase 1 y 2 (Shah *et al.*, 2014). En el mismo estudio, se realizó la pesquisa del gen plasmídico *aac(6)-Ib-cr* en una bacteria asociada a sedimentos marinos de un centro de cultivo de salmones en Chile, este gen disminuye la susceptibilidad a ciprofloxacino, norfloxacino y otorga resistencia a kanamicina, tobramicina y amikacina, y es idéntico al gen que portan cepas de *E. coli* aisladas desde tracto urinario de pacientes humanos, lo que sugiere el flujo de genes entre bacterias aisladas desde diferentes ambientes (Aedo *et al.*, 2014). En otro contexto, el estudio realizado por Tomova *et al.* (2015) respalda esta movilidad de genes de resistencia entre cepas ambientales y clínicas, ya que informan una alta incidencia del gen *qnrB* (otro gen plasmídico que disminuye la susceptibilidad a fluoroquinolonas) en bacterias resistentes a quinolona que provienen de centros de cultivo de salmones, y demostró que en cepas de *E. coli* resistente a quinolona aislada desde tracto urinario de pacientes que viven cerca del centro de cultivo muestreado, eran significativamente mayor la presencia de genes *qnrB*, *qnrS*, y *qnrA*, comparado con aislados provenientes de pacientes de otras localidades no asociadas a salmonicultura. Por lo tanto, desde una perspectiva de salud humana, esto cobra gran relevancia debido a que, si no se realizan mejoras en la utilización de antibióticos, las proyecciones indican que las infecciones producidas por bacterias multiresistentes serán la primera causa de muerte a nivel global en el año 2050, con una incidencia de 10 millones de muertes por año (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). Por esto, es importante caracterizar e identificar las potenciales fuentes de adquisición de resistencia a antibióticos en bacterias, y abordar el tema de la resistencia a antibióticos con una perspectiva de “una salud” (del inglés *One Health*) y que la OMS define como un enfoque para diseñar e implementar programas, políticas, legislación e investigación en el que múltiples sectores se comunican y trabajan juntos para lograr mejores resultados de salud pública (WHO, 2017), promoviendo la investigación multidisciplinaria en el área de la resistencia a antibióticos (Higuera-Llantén *et al.*, 2018). Esto debido a que se ha

determinado que la ocurrencia de bacterias resistentes no se restringe al ambiente hospitalario, sino que también se encuentra en ambientes naturales, como lo indica el trabajo de D'Costa *et al.*, (2006), quienes encontraron que bacterias provenientes de diferentes tipos de suelos (de zonas urbanas, agrícolas y bosques) eran capaces de sobrevivir en presencia de dos y hasta 15 antibióticos, incluyendo algunos de uso humano. Por lo tanto, es importante considerar al medio ambiente (suelo, glaciares, animales, entre otros) como un posible reservorio de genes de resistencia a antibióticos, ya que, por ejemplo, genes de resistencia encontrados en bacterias del suelo pueden ser también descritos en bacterias patógenas aisladas en centros de salud (Forsberg *et al.*, 2012).

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la actividad salmonícola tiene un evidente efecto sobre la composición de las comunidades bacterianas aledañas a los centros de cultivo; sin embargo, no se observó una relación entre la abundancia de los genes de resistencia pesquisados y la distancia de las estaciones de muestreo desde el centro de cultivo, lo que permite rechazar la hipótesis planteada.



5. CONCLUSIONES

No se evidencia un gradiente de influencia del centro de cultivo de salmones en el recuento bacteriano de las estaciones muestreadas.

Se observa alta similitud en la composición de las comunidades bacterianas de las dos estaciones más cercanas al centro de cultivo. Esto podría indicar una modificación del ambiente inmediato.

Se observa una mayor abundancia de genes de resistencia en las estaciones más cercanas al centro de cultivo, lo que podría evidenciar un gradiente de influencia.

La resistencia a florfenicol se encuentra mediada principalmente por el gen *floR*, mientras que la resistencia a tetraciclina esta mediada por diferentes genes (*tet* y *otr*), sin observarse predominancia de alguno.

No obstante, la presencia de genes de resistencia en las muestras de agua, éstos no se estaban expresando al momento del muestreo, lo que indicaría que el ambiente marino estaría actuando como reservorio de genes de resistencia.

6. PROYECCIONES

La salmonicultura es una de las principales industrias que aportan al desarrollo económico de Chile, es por eso que estudios como el desarrollado en esta tesis, que ayudan a comprender las implicancias de los métodos actuales de control de enfermedades en salmones pueden aportar al conocimiento de los efectos de la alta utilización de antibióticos en el ambiente marino. Sin embargo, se requieren estudios adicionales que permitan conocer con mayor detalle los posibles efectos de esta industria en el ambiente marino, para lo cual, técnicas como cuantificación de antibióticos en el ambiente y estudios de metagenómica son necesarios para poder determinar variaciones en las comunidades bacterianas y variaciones en el resistoma de los centros de cultivo y su entorno ambiental inmediato.



7. REFERENCIAS

Aedo S., L. Ivanova, A. Tomova y F. Cabello. 2014. Plasmid-Related Quinolone Resistance Determinants in Epidemic *Vibrio parahaemolyticus*, Uropathogenic *Escherichia coli*, and Marine Bacteria from an Aquaculture Area in Chile. *Microbial Ecology* 6: 324–328.

Alonso A. P. Sánchez y JL. Martínez. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 3: 1-9.

Arcangioli M., S. Leroy-Sétrin, J. Martel y E. Chaslus-Dancla. 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiology Letters* 174: 327–332.

Baquero, F., JL Martínez y R. Cantón. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 260–265.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *American Journal of Clinical Pathology.* 36, 493 – 496.

Buschmann A., D. López y A. Medina. 1996. A review of the environmental effects and alternative production strategies of marine aquaculture in Chile. *Aquacultural Engineering* 15: 397-421.

Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., Henríquez, L. A., Ivanova, L., et al. 2012. Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One* 7:e42724.

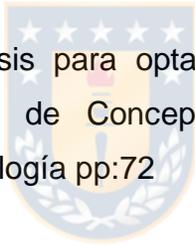
Bentzon-Tilia, M., Sonnenschein, E. C., & Gram, L. (2016). Monitoring and managing microbes in aquaculture - Towards a sustainable industry. *Microbial biotechnology*, 9(5), 576-84.

Cabello FC., H.P. Godfrey, A. Tomova, L. Ivanova, H. Doelz, A. Millanao, A.H. Bushmann. 2013. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15: 1917-1942.

CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from farm animals; Approved Standard, second ed. CLSI (formerly National Committee of Clinical Laboratory Standards—NCCLS), 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087, USA. Doc. M31-A2.22

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: CLSI; 2018

Cigarroa Cuevas, Camila. AÑO. Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias mención Microbiología. Universidad de Concepción (Chile). Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología pp:72



Çiçek A., A. Düzgün, A. Saral, T. Kayman, Z. Çizmeçi, P. Balcı, T. Dal, M. Fırat, İ. Tosun, Y. Alıntop, A. Çalışkan, Y. Yazıcı y C. Sandallı. 2013. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(9): 743–747.

Coyne R., P. Smith, I. Dalsgaard, H. Nilsend, H. Kongshaug, Ø. Bergha y O. Samuelson. 2006. Winter ulcer disease of post-smolt Atlantic salmon: An unsuitable case for treatment? *Aquaculture.* 253: 171-178.

D'Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377.

Fernández-Alarcón C., C. D. Miranda, S. Singer, Y. López, R. Rojas, H. Bello¹, M. Domínguez y G. González-Rocha. 2008. Detection of the *floR* Gene in a Diversity of Florfenicol Resistant Gram-Negative Bacilli from Freshwater Salmon Farms in Chile. *Zoonoses Public Health* 57:181-8.

Finley, R.L., Collignon, P., Larsson, D.G.J., McEwen, S.A., Li, X.-Z., Gaze, W.H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D.W., Topp, E., 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Disease*. 57: 704–710.

Forsberg K., A. Reyes, B. Wang, E. Selleck, M. Sommer y G.Dantas. 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* 337: 1107-1111.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno N. y Rossi, P. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4: 634-643.

Fryer JL, Sanders JE. 1981. Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Microbiology*, 35:273-98.

Folke C., N. Kautsky, H. Berg, A. Jansson y M. Troell. 1998. The ecological footprint concept for sustainable seafood production: a review. *Ecological Applications* 8: S63-S71.

Granada, L., Sousa, N., Lopes, S. and Lemos, M. F. 2016, Is integrated multitrophic aquaculture the solution to the sectors' major challenges? – a review. *Reviews in Aquaculture*, 8: 283-300.

Hatosy S., J. Martiny. R. Sachdeva, J. Steele, J. Fuhrman y A.Martiny. 2015. Beta diversity of marine bacteria depends on temporal scale. *Ecology*, 94: 1898–1904. Hektoen H., J. Berge., V. Hormazabal y M Yndestad. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* 133: 175-184.

Higuera-Llantén S, Vásquez-Ponce F, Barrientos-Espinoza B, Mardones FO, Marshall SH, Olivares-Pacheco J. 2018. Extended antibiotic treatment in salmon farms select multiresistant gut bacteria with a high prevalence of antibiotic resistance genes. *PLoS One*.11;13(9):e0203641.

Huang L., YB. Xu, JX. Xu, JY. Ling, JL. Chen, JL. Zhou, L. Zheng, QP. Du. 2017. Antibiotic resistance genes (ARGs) in duck and fish production ponds with integrated or non-integrated mode. *Chemosphere* 168:1107-1114.

Ibieta, P., Venegas, C., Takle, H., Hausdorf, M., and Tapia, V. 2011. Chilean Salmon Farming on the Horizon of Sustainability: Review of the Development of a Highly Intensive Production, the ISA Crisis and Implemented Actions to Reconstruct a More Sustainable Aquaculture Industry. Rijeka: INTECH Open Access Publisher.

Gongalves Ferreira C., B. Andre Nunes, J. de Melo Henriques-Almeida y L. Guilhermino. 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 452–458.

Iriarte JL, Pantoja S, Daneri G. 2014. Oceanographic processes in Chilean fjords of Patagonia: from small to large-scale studies. *Progress Oceanography*, 129:1–7.

Miranda C., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz y M.Roberts. 2003. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 883-888.

Keen, P.L., and Montfort, M.H.M.M. (Editors). 2012. Antimicrobial resistance in the environment. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., USA. N°PP

Kemper 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial Environment. *Ecological Indicators* 8:1 – 13.

Kerry J., R. Coyne, D. Gilroy, M. Hiney y P. Smith. 1996. Spatial distribution of oxytetracycline and elevated frequencies of oxytetracycline resistance in sediments beneath a marine salmon farm following oxytetracycline therapy. *Aquaculture* 145: 31-39.

Keyes K., C. Hudson, J. Maurer, S. Thayer, D. White y M. Lee. 2000. Detection of Florfenicol Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolated from Sick Chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 421–424.

Lebaron P., P. Servais, M. Troussellier, C. Courties, J. Vives-Rego, G. Muyzer, L. Bernard, T. Guindulain, H. Schäfer y E. Stackebrandt. 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology* 19:255-267.

Lopes B., B. Evans y S. Amyes. 2012. Disruption of the blaOXA-51-like gene by ISAba16 and activation of the blaOXA-58 gene leading to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* Ab244. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 67: 59–63.

Maisey K., R. Montero y M. Christodoulides. 2017. Vaccines for piscirickettsiosis (salmonid rickettsial septicaemia, SRS): the Chile perspective. *Expert Review Vaccines*. 16:215-228.

Márquez, C., M. Labbate, C. Raymondo, J. Fernández, A. M. Gestal, M. Holley, G. Borthagaray, and H. W. Stokes. 2008. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, 46:3417-3425.

Millanao A., C. Barrientos-Schaffeld, C. D. Siegel-Tike, A. Tomova, L. Ivanova, Henry P. Godfrey, H. J. Dölz, A. H. Buschmann, F. C. Cabello. 2018. Resistencia a los antimicrobianos en Chile y el paradigma de Una Salud: manejando los riesgos para la salud pública humana y animal resultante del uso de antimicrobianos en la acuicultura del salmón y en medicina. *Rev Chilena Infectol* 35: 299-303.

MINAGRI (Ministerio de Agricultura) <https://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=171845>

Miranda, C. D., and Zemelman, R. 2002a. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*. 293: 207–218.

Miranda, C. D., and Zemelman, R. 2002b. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212, 31–47.

Miranda C., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz y M.Roberts. 2003. Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 883-888.

Miranda, C. D., and Rojas, R. 2007. Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture* 266, 39–46.

Miranda, C., F. Godoy y M. Lee. 2018. Current Status of the Use of Antibiotics and the Antimicrobial Resistance in the Chilean Salmon Farms. *Frontiers in Microbiology*. 9:1284.

Muyzer, G., EC de Waal, AG Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:695–700.

Muyzer G. y K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127–141.

Niklitschek E., D. Soto, A. Lafon, C. Molinet y P. Toledo. 2013. Southward expansion of the Chilean salmon industry in the Patagonian Fjords: main environmental challenges. *Reviews in Aquaculture* 5: 172–195.

Nikolakopoulou T., S. Egan, L. Van Overbeek, G. Guillaume, H. Heuer, E. WellingtonJan, D. Van Elsas, J. Collard, K. Smalla y A.Karagouni. 2005. PCR Detection of Oxytetracycline Resistance Genes *otr(A)* and *otr(B)* in Tetracycline-Resistant Streptomycete Isolates from Diverse Habitats. *Current Microbiology* 51:211–216.

Pantoja S. JL. Iriarte y G. Daneri. 2011. Oceanography of the Chilean Patagonia. *Continental Shelf Research* 31: 149-153.

Paulsen I. M. Brown y R. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews* 60: 575–608.

Pepper I y C. P. Gerba, Chapter 8 - Environmental Sample Collection and Processing, Editor(s): Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, Terry J. Gentry, *Environmental Microbiology (Third Edition)*, Academic Press, 2015, Pages 157-175, ISBN 9780123946263

Reed H. y J. Martiny. Testing the functional significance of microbial composition in natural communities, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 62, Issue 2, 1 November 2007, Pages 161–170.

Susan J. Rosser, Hilary-Kay Young, Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment , *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 44, Issue 1, July 1999, Pages 11–18.

Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations (Review on Antimicrobial Resistance, 2016); http://amrreview.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf

Roberts, M. C., No, D., Kuchmiy, E., y Miranda, C. D. 2015. Tetracycline resistance gene *tet(39)* identified in three new genera of bacteria isolated in 1999 from Chilean salmon farms. *Journal of Antimicrobial. Chemotherapy*, 70, 619–621.

Saavedra, J., Grandón, M., Villalobos-González, J., Bohle, H., Bustos, P., & Mancilla, M. 2018. Isolation, Functional Characterization and Transmissibility of p3PS10, a Multidrug Resistance Plasmid of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 923.

SERNAPESCA 2016. Informe de uso de antimicrobianos.

http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sobre_uso_de_antimicrobianos-2016.pdf

SERNAPESCA (2017a). Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos 2016.

Valparaíso: Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura.

http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sanitario_2016.pdf

SERNAPESCA (2017b). Informe Sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2016. Valparaíso.

http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/informe_sobre_uso_de_antimicrobianos_2017_0.pdf

Shah S., F. Cabello, T. L'Abée-Lund, A. Tomova, H. Godfrey, A. Buschmann y H. Sørum. 2014. Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental Microbiology* 16: 1310–1320.

Shneider W., I. Perez-Santos L. Ross, L Bravo, R. Seguel y F. Hernandez. 2014. On the hydrography of Puyuhuapi Channel, Chilean Patagonia. *Progress in Oceanography* 129: 8-18.

Sievers, H., 2008. Temperature and salinity in the austral Chilean channels and fjords. *Progress in the Oceanographic Knowledge of Chilean Interior Waters from Puerto Montt to Cape Horn*, Comité Oceanográfico Nacional – Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 31–36.

Soto D. y F. Norambuena. 2004. Evaluation of salmon farming effects on marine systems in

the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology* 20: 493-501.

Surette M. y G. Wrigh. 2017. Lessons from the Environmental Antibiotic Resistome. *Annual Review of Microbiology* 71:309-329.

Markley J. y T. Wencewicz. 2018. Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1058.

Tapia, Fabián y Giglio, Susana. 2010. Modelos para la Evaluación de la Capacidad de Carga de Fiordos Aplicables a Ecosistemas del Sur de Chile. Valdivia, Chile: WWF

Thaker M., P. Spanogiannopoulos y G. Wright. 2010. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67: 419–431.

Tomova A., L.Ivanova, A. Buschmann, M. Rioseco, R. Kalsi, H. Godfrey Y F. Cabello. 2015. Antimicrobial resistance genes in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a región of intensive aquaculture. *Environmental Microbiology* 7: 803–809.

Van de Klundert, J.A.M. and Vliegenthart, J.S. (1993) PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In *Diagnostic Molecular Microbiology* eds Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C. and White, T.J. pp. 547– 552. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Ventura M., M. Elli, R. Reniero y R. Zink. 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology* 36: 113–121.

Vester B. 2018. The *cfr* and *cfr*-like multiple resistance genes. *Research in Microbiology*. 169: 61-66.