



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Biológicas

**DETECCIÓN DE BETALACTAMASAS, DIVERSIDAD Y LOCALIZACIÓN
GENÉTICA DE SUS GENES EN BACTERIAS AISLADAS DE INTESTINO DE
PECES DEL LAGO CHUNGARÁ, CHILE**

POR VICTORIA SOFÍA MARDONES VERDUGO

**Tesis presentada en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado académico de Magister en Ciencias mención
Microbiología**

Profesor Guía

Gerardo González-Rocha
Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor co-Guía

Daniel Gómez Uchida
Departamento de Zoología
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

2025

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académico, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis tutores, Dr. Gerardo González Rocha y Dr. Daniel Gómez Uchida, por todo el apoyo entregado durante el desarrollo de mi tesis. De igual manera, agradecer a la Dra. Celia Fernandes de Lima, docente e investigadora de la Facultad de Odontología, quien, pese a no ser mi tutora, siempre estuvo dispuesta a ayudarme.

Agradecer a cada una de las personas que conforman el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) por el apoyo y ayuda brindada con cada duda que surgió durante este proceso.

Al proyecto ANID Iniciativa Científica Milenio NCN2021_056, dirigido por el Dr. Daniel Gómez Uchida, correspondiente al Núcleo Milenio de Salmónidos Invasores Australes (INVASAL).

A mi familia, amigos y mi pareja, quienes son un pilar fundamental en mi vida y me han motivado a llegar donde estoy. Por último y más importante, a mis padres, quienes me vieron crecer durante todas mis etapas de formación y motivaron siempre a superarme.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
1. Los antibióticos y el fenómeno de resistencia	1
2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	4
3. Antibióticos betalactámicos.....	9
4. Resistencia a antibióticos betalactámicos mediada por betalactamasas 11	
5. Resistencia a los antibióticos en ambientes no clínicos	13
6. Ambientes extremos: el caso del Lago Chungará	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	22
HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
1. Selección de cepas bacterianas	27
2. Detección fenotípica de betalactamasas	28
3. Detección fenotípica de BLEEs y AmpC	29
4. Determinación de los niveles de resistencia a antibióticos	31
5. Extracción de ADN bacteriano.....	32
6. Identificación molecular de las cepas	33
6.1 Amplificación del gen del ARNr 16S.....	33
6.2 Secuenciación e identificación de las cepas	35
7. Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR	36
8. Detección molecular de betalactamasas	38
9. Secuenciación de genoma completo.....	41
9.1 Selección de cepas	41

9.2	Extracción de ADN bacteriano y secuenciación	41
9.3	Análisis bioinformáticos	42
10.	Análisis estadístico	45
RESULTADOS.....		46
1.	Cepas de trabajo.....	46
2.	Detección fenotípica de betalactamasas	47
3.	Niveles de resistencia a antibióticos	48
4.	Identificación molecular de las cepas	53
5.	Relación genética de las cepas.....	56
6.	Detección molecular de betalactamasas	62
7.	Secuenciación de genoma completo.....	62
7.1	Selección de cepas	62
7.2	Identificación bacteriana.....	67
7.3	Anotación de genes	72
7.4	Identificación de genes de resistencia.....	75
7.5	Identificación de elementos genéticos móviles	81
8.	Análisis estadísticos.....	83
DISCUSIÓN		86
1.	Detección fenotípica de betalactamasas	87
2.	Niveles de resistencia a antibióticos	89
3.	Identificación molecular de las cepas	92
4.	Relación genética de las cepas.....	94
5.	Detección molecular de betalactamasas	100
6.	Análisis bioinformáticos.....	101
CONCLUSIÓN.....		111
BIBLIOGRAFÍA		113
ANEXOS.....		126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Partidores utilizados para la amplificación del gen ARNr 16Ss mediante PCR.....	34
Tabla 2 .- Reactivos utilizados para la amplificación del gen ARNr 16s mediante PCR.....	34
Tabla 3.- Partidores utilizados para la amplificación de secuencias intergénicas mediante ERIC-PCR.....	37
Tabla 4.- Componentes utilizados para llevar a cabo ERIC-PCR.	38
Tabla 5.- Partidores utilizados para la amplificación genes de betalactamasas mediante PCR.....	40
Tabla 6.- Componentes utilizados la amplificación de genes de betalactamasas mediante PCR.	40
Tabla 7.- Tamaño y peso de los ejemplares de peces del Lago Chungará, Chile.	47
Tabla 8.- Total de cepas productoras de betalactamasas tipo AmpC y BLEEs.	48
Tabla 9.- Identificación molecular de los aislados de intestino de peces del Lago Chungará, Chile, mediante secuenciación del gen del ARNr 16S.	55
Tabla 10.- Selección de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, para someter a secuenciación de genoma completo.....	64
Tabla 11.- Reporte de calidad de los ensamblajes de genoma completo de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	66
Tabla 12.- Identificación de las cepas secuenciadas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, obtenido con JSpeciesWS.....	68

Tabla 13.- Identificación de las cepas secuenciadas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, obtenido con pubMLST y fastANI.....	69
Tabla 14.- Análisis de completitud y contaminación de genomas de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	72
Tabla 15.- Anotación funcional de genes en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.....	74
Tabla 16.- Genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según especie de pez, identificados con ABRicate.	77
Tabla 17.- Genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según el género bacteriano, identificados con ABRicate.	78
Tabla 18.- Genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según especie de pez, identificados con BLDB.....	79
Tabla 19.- Genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según género bacteriano, identificados con BLDB.....	80
Tabla 20.- Contigs asociados a secuencias de plásmidos identificados en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .- Imágenes de los peces que habitan el lago Chungará, el río Chungará y la vertiente Mal Paso.	19
Figura 2 .- Distribución del diámetro de los halos de inhibición de antibióticos betalactámicos sobre 90 bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará.	21
Figura 3 .- Mapa del sitio de estudio.	27
Figura 4 .- Distribución de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos betalactámicos en bacterias aisladas del intestino de <i>O. mykiss</i> (T), <i>O. chungarensis</i> (O) y <i>T. chungaraensis</i> (B) del Lago Chungará, Chile.	52
Figura 5 .- Distribución de la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina-ácido clavulánico (2:1) (AMC) en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.....	53
Figura 6 .- Distribución de los aislados según la identificación molecular en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, mediante secuenciación del gen del ARNr 16S.....	56
Figura 7 .- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género <i>Aeromonas</i> aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	58
Figura 8 .- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género <i>Serratia</i> aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile...	59
Figura 9 .- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género <i>Rahnella</i> aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	60

Figura 10.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género <i>Shewanella</i> aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	60
Figura 11.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género <i>Pseudomonas</i> aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.	62
Figura 12.- Análisis de Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) basado en la detección de genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.....	84
Figura 13.- Análisis de Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) basado en la detección de genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.....	85

RESUMEN

La resistencia a antibióticos (RA) es una creciente problemática para la salud global, en especial la resistencia a antibióticos betalactámicos, ampliamente usados en clínica humana. El principal mecanismo de resistencia a estos compuestos es la producción de betalactamasas. Bajo el enfoque “Una Salud”, se reconoce la necesidad de estudiar la RA en diversos entornos. El Lago Chungará (4500 m.s.n.m.), hábitat de la especie invasora *Onchorhynchus mykiss* y los peces endémicos *Orestias chungarensis* y *Trichomycterus chungaraensis*, representa un entorno extremo único para investigar este fenómeno. Se estudió la producción de betalactamasas en cepas bacterianas aisladas del intestino de estos peces y se determinaron los niveles de resistencia a 8 antibióticos betalactámicos. Veinte cepas fueron sometidas a secuenciación de genoma completo para identificar genes codificantes de betalactamasas. Se detectó actividad de betalactamasas en más del 90% de las cepas y se identificaron 8 géneros bacterianos. Se detectaron betalactamasas de clases A, B, C y/o D. Los análisis estadísticos demostraron diferencias significativas según géneros bacterianos

($p=0,000999$), pero no entre especie de peces ($p=0,985$). Las cepas analizadas presentaron baja susceptibilidad a antibióticos betalactámicos, que podría estar asociada a la producción de betalactamasas. La diversidad de estas enzimas depende del género bacteriano y no de la especie hospedera, lo que sugiere una baja presión de selección ambiental en este ecosistema extremo.

ABSTRACT

Antibiotic resistance (AR) is an emerging global health concern, particularly resistance to betalactam antibiotics, which are widely used in human clinical settings. The primary mechanism of resistance to these compounds is the production of betalactamases. Within the One Health approach, there is a recognized need to study AR across diverse environments. Lake Chungará (4,500 m.a.s.l.), habitat of the invasive species *Oncorhynchus mykiss* and the endemic fishes *Orestias chungarensis* and *Trichomycterus chungaraensis*, represents a unique extreme environment to investigate this phenomenon. The study examined betalactamase production in bacterial strains isolated from the intestines of these fishes and determined resistance levels to eight betalactam antibiotics. 20 strains underwent whole-genome sequencing to identify betalactamase-encoding genes. betalactamase activity was detected in over 90% of the strains, and eight bacterial genera were identified. Betalactamases from classes A, B, C, and/or D were detected. Statistical analyses revealed significant differences among bacterial genera ($p = 0.000999$), but not between fish species ($p = 0.985$). The analyzed strains

exhibited low susceptibility to betalactam antibiotics, potentially associated with betalactamase production. The diversity of these enzymes was dependent on bacterial genus rather than host species, suggesting a low environmental selection pressure in this extreme ecosystem.

INTRODUCCIÓN

1. Los antibióticos y el fenómeno de resistencia

Los antibióticos son compuestos químicos que pueden ser producidos de manera natural o sintética y tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos (Lewis, 2013). Dado el uso que tiene contra el tratamiento de infecciones bacterianas, también se les conoce como antibacterianos (Urquiza Ayala et al., 2018). Fue en 1928 cuando Alexander Fleming descubrió la penicilina, primer antibiótico de origen natural (Gaynes, 2017). En cuanto a su clasificación, esta se basa en diversos criterios: 1) Origen: naturales, sintéticos o semi-sintéticos; 2) Espectro de actividad: amplio espectro si su actividad afecta tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas o de reducido espectro si solo o preferentemente actúan sobre uno de estos grupos; 3) Potencia y naturaleza del efecto antimicrobiano

bactericida si resultan en muerte bacteriana o bacteriostáticos si sólo producen la inhibición del crecimiento (Cué Brugueras, 1998).

El fenómeno de resistencia a un antibiótico (RA, de aquí en adelante) se genera cuando una bacteria deja de ser afectada por un compuesto que originalmente tenía la capacidad de impedir su crecimiento o producir su muerte (Muteeb et al., 2023). La RA está más bien asociado al ámbito clínico, donde se define resistencia y susceptibilidad en base a la posibilidad de éxito terapéutico, teniendo en cuenta además conceptos como la farmacodinamia y farmacocinética de los antibióticos (Martinez, 2014). La RA es consecuencia de la evolución del genoma de las bacterias, a través de diferentes mecanismos, y que es seleccionada como resultado de la presión de selección que ejercen estos compuestos al ser usados en diversas actividades (Gaubá & Rahman, 2023). Hay ciertos eventos que aumentan la presión de selección ejercida sobre las bacterias, como el uso indiscriminado de los antibióticos, relacionado con el consumo innecesario de estos compuestos, tratamientos inexactos o errados y la automedicación, entre otros (Uddin et al., 2021). Esto ha posicionado a la RA como un problema global, donde el rápido aumento

de bacterias resistentes contrasta con el lento avance en el descubrimiento de nuevos compuestos antibacterianos (Belloso, 2009). Un estudio reciente, estimó que se produjeron casi 5 millones de muertes atribuidas o asociadas a bacterias resistentes a antibióticos durante 2019, siendo una de las causas que lideran el total de muertes anuales a nivel mundial (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

La RA puede ser natural o adquirida. La RA natural ocurre cuando los genes están siendo constantemente expresados y generalmente es un rasgo compartido a nivel de género o especie bacteriana (gen cromosómico), resultando en una resistencia intrínseca (Reygaert, 2018). Por otro lado, la RA adquirida es resultado de mutaciones en el material genético o bien la adquisición de genes por transferencia horizontal de genes (THG), ya sea a través de transformación, conjugación o transducción (Uddin et al., 2021). Si bien las mutaciones pueden llevar al desarrollo de resistencia a antibióticos, estas se transmiten de manera vertical de una generación a otra, lo que limita la diseminación del fenotipo resistente (Botts et al., 2017). En contraste, la THG permite el intercambio de material genético incluso entre diferentes

especies bacterianas, contribuyendo en gran parte a la diseminación de genes de resistencia y el desarrollo de bacterias resistentes (Sun et al., 2019). A través de la conjugación es posible la transferencia de plásmidos portadores de diversos genes de resistencia, como lo son los plásmidos multidrogo-resistentes (MDR), lo que puede llevar al desarrollo de resistencia a diversos antibióticos de manera rápida (Cheng et al., 2024).

2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos son diversos, pero la mayoría se pueden clasificar dentro de cuatro grandes grupos, y dependerán tanto del compuesto como de la bacteria (Reygaert, 2018):

Limitación en el ingreso del antibiótico a la célula bacteriana: Este caso tiene directa relación con la envoltura celular y su permeabilidad. En bacterias Gram negativas, la membrana externa provee una barrera para ciertos antibióticos (Wang et al., 2021). Asimismo, hay bacterias que carecen de pared celular, lo que les confiere resistencia intrínseca a ciertos antibióticos como los betalactámicos y glucopeptidos (Gautier-Bouchardon, 2018). Las porinas, presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas, son la vía de entrada de muchas moléculas hidrofílicas, y por lo tanto son capaces de regular la entrada de diversos compuestos, mediante la disminución de estos canales y por mutaciones que cambian el diámetro del canal formado por las porinas (Fernandez & Hancock, 2012). Otro fenómeno que se ha observado es la RA mediada por la formación de biopelículas, donde el ingreso de estos compuestos se ve dificultado por la matriz de exopolisacárido y otras moléculas (Reygaert, 2018). En bacterias Gram positivas, al no poseer membrana externa, la resistencia mediada por limitaciones en el ingreso (permeabilidad) de los compuestos no es tan prevalente.

Modificación del sitio blanco: los compuestos antibacterianos poseen diversos blancos dentro de la célula como proteínas o ARN en el ribosoma, ADN topoisomerasas y proteínas fijadoras de penicilinas (PBP, por su sigla en inglés), entre otros. Estas últimas enzimas encargadas de generar la polimerización y el entrecruzamiento de los componentes de la pared celular (Kapoor et al., 2017). Se ha observado, especialmente en bacterias Gram positivas, que cambios en la estructura o número de proteínas PBP generan alteraciones en la unión de antibióticos como los betalactámicos (Zapun et al., 2007). Por otra parte, ciertas moléculas son capaces de cambiar la polaridad de la membrana, impidiendo la unión de antibióticos que tienen como blanco la envoltura celular. Se ha observado también, como mecanismo de resistencia, la modificación de los precursores de la pared celular, lo que disminuye la capacidad de unión de los antibióticos (Selim, 2022).

En el caso del ribosoma, los mecanismos son variados, incluyendo metilaciones del ARNr y mutaciones en genes que codifican componentes ribosomales, lo que afecta procesos como el ensamble del ribosoma (Gomez et al., 2017; Osterman et al., 2020).

Por otra parte, mutaciones en los genes que codifican para la ADN girasa (*gyrA*, *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC*, *parE*) generan resistencia a las quinolonas, antibióticos cuyo blanco es la replicación del ADN. Estas mutaciones reducen la afinidad de unión de la quinolona a sus enzimas blanco, disminuyendo su eficacia (Bansal & Tandon, 2011).

En antibióticos que interfieren con rutas metabólicas, como las sulfonamidas y trimetoprima, se han observado mutaciones en los sitios activos de las enzimas por las que compiten contra el sustrato natural (Huovinen, 2001).

Inactivación del compuesto: las bacterias son capaces de inactivar los antibióticos enzimáticamente principalmente a través de dos vías: por degradación (hidrólisis) del compuesto o mediante la adición de grupos químicos al mismo (modificación) (Reygaert, 2018). En el caso de la degradación, las betalactamasas son el grupo de enzimas más prevalentes, capaces de hidrolizar el anillo betalactámico de estos antibióticos, lo que genera la pérdida de la actividad antibacteriana de estos compuestos. Además

de la degradación, la adición de grupos químicos a los antibióticos disminuye la afinidad o impide que estos se unan a sus blancos, generando resistencia, como ocurre en el grupo de los aminoglucósidos, por las enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) (Blair et al., 2014).

Bombas de expulsión: las bacterias poseen proteínas codificadas a nivel del cromosoma, las cuales son destinadas a la eliminación de compuestos tóxicos, como metales pesados, contaminantes orgánicos, metabolitos y antibióticos, entre otros (Blanco et al., 2016). Estos sistemas de expulsión pueden ser específicos, es decir, eliminar solo un compuesto o grupo de antimicrobianos a la vez, o bien tener la capacidad de eliminar más de una clase de antibióticos u otros compuestos (bombas multidroga) (Sharma et al., 2019).

Por otro lado, hay mecanismos de resistencia que escapan de la clasificación anterior. La protección del sitio blanco ha demostrado ser un mecanismo de resistencia clave, en el cual una proteína se une al blanco, sin necesariamente generar modificaciones estructurales, pero protegiendo el blanco de la unión

del antibiótico (Wilson et al., 2020). Ampliamente estudiados son algunos genes *tet* que codifican proteínas capaces de unirse al ribosoma, evitando así la unión de las tetraciclinas (Roberts & Schwarz, 2016). Asimismo, están los genes *qnr*, los cuales codifican proteínas que protegen las ADN girasas y topoisomerasas IV (Rodríguez-Martínez, 2005). El *bypass* metabólico o *bypass* del blanco es otra estrategia mediante la cual las bacterias generan vías metabólicas alternativas evitando el blanco del antibiótico, lo cual puede ocurrir mediante la adquisición de nuevos genes que codifican proteínas que tienen las mismas propiedades del blanco original, pero sin ser afectados por el compuesto antibacteriano (Munita & Arias, 2016). Uno de los mayores ejemplos es la adquisición del gen *mecA*, codificante para PBP2a en *Staphylococcus aureus*, homóloga a la proteína PBP original, pero con menor afinidad hacia los antibióticos betalactámicos (Stapleton & Taylor, 2002).

3. Antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos son una de las familias de antibióticos más importantes en cuanto a su aplicación en la clínica humana, donde ya a inicios de los años 2000 abarcaban más del 60% de la producción total del mercado de los antibióticos (Elander, 2003). El primer betalactámico de origen natural descubierto fue la penicilina, y hoy ya encontramos una gran variedad de compuestos pertenecientes a esta familia. Estos se caracterizan por poseer en común, como parte de su estructura química, el anillo betalactámico, una amida cíclica de 4 átomos que, en conjunto con un anillo secundario u otro radical, el cual varía dependiendo del tipo de betalactámico, determinan el núcleo del betalactámico (Suarez & Gudiol, 2009). Las distintas asociaciones entre el anillo y los radicales resultan en los diferentes grupos de betalactámicos, como las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, entre otros. Estos compuestos son clasificados como antibióticos bactericidas, y estructuralmente son similares a un motivo de los pentapéptidos de la pared bacteriana (Turner et al., 2022). Así, tienen la capacidad de inhibir las enzimas encargadas de generar el entrecruzamiento de la pared celular (PBPs), debilitando la envoltura de la célula, que entre otros procesos llevan a la lisis y muerte bacteriana (Suarez & Gudiol, 2009).

4. Resistencia a antibióticos betalactámicos mediada por betalactamasas

La resistencia a los antibióticos betalactámicos ocurre a través de tres mecanismos: (i) evitando la unión de la droga a las enzimas PBP, (ii) a través de bombas de expulsión o bien (iii) mediante la hidrólisis enzimática (Reygaert, 2018). Para evitar la interacción de la droga con las enzimas, ocurren modificaciones en la capacidad de unión, lo que puede estar dado por mutaciones en las PBPs existentes o bien mediante la adquisición de nuevas PBPs (Sethuvel et al., 2023).

El mecanismo de resistencia más efectivo frente a estos antibióticos ha sido la producción de betalactamasas, que pueden hidrolizar el anillo betalactámico, inactivando el compuesto (Kong et al., 2011). Hoy en día, ya se han descrito más de 300 variantes, y su clasificación se basa en dos

acercamientos: según su estructura molecular (secuencia genética y proteica) y por las características funcionales y bioquímicas. Para la segunda clasificación se trabaja con distintos criterios, como el perfil de inhibición de la enzima, la tasa de hidrólisis y la afinidad de unión al sustrato, entre otros (Kong et al., 2011). Según la estructura molecular, las betalactamasas se dividen en cuatro grupos: A, B, C y D. Los grupos A, C y D poseen serina en su sitio activo, mientras que las de clase B, llamadas también metalo-betalactamasas, presentan por lo menos una molécula de zinc en su sitio activo para generar la hidrólisis del compuesto (Bush & Jacoby, 2010). Independiente del grupo al que pertenezcan, las betalactamasas pueden codificarse en elementos genéticos móviles, como plásmidos, y adquirirse mediante transferencia horizontal de genes o bien estar codificadas en el cromosoma bacteriano. Para este último caso existen enzimas que se expresan constitutivamente o bien son inducibles, cuando su expresión aumenta por la presencia de antibióticos betalactámicos (Kong et al., 2011). Un ejemplo es la enzima AmpC, la primera betalactamasa caracterizada, proveniente de una cepa de *Escherichia coli*, la cual se encuentra expresada constitutivamente a bajos niveles, pero mutaciones en el gen pueden llevar a una sobreexpresión de la enzima (Reygaert, 2018). Las primeras betalactamasas, con actividad

frente a los antibióticos de primera generación, fueron seguidas por las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, cefalosporinas (incluyendo las de tercera generación) y monobactámicos, mientras que no son capaces de actuar sobre betalactámicos del tipo carbapenémicos (Seral Garcia et al., 2010). Dentro de las BLEE encontramos familias ampliamente distribuidas, como SHV, TEM y CTX-M, las cuales fueron descritas por primera vez en los años 80, y son de naturaleza plasmídica, lo que incrementa su potencial de diseminación por mecanismos de transferencia horizontal (Miranda García, 2013).

5. Resistencia a los antibióticos en ambientes no clínicos

Pese a que los estudios de RA se han enfocado en clínica humana, principalmente en el estudio de patógenos, muchos antibióticos tienen un origen natural y han sido aislados de microorganismos provenientes de suelos

y otros ambientes, especialmente del género *Streptomyces* (Embley & Stackebrandt, 1994). Se ha hipotetizado que la producción de estos compuestos tiene como objetivo competir con otros microorganismos, actuar como moléculas señal o mediar interacciones con hospederos (Hutchings et al., 2019). Bajo el mismo contexto, estudios han demostrado que las bacterias han sido capaces de evolucionar y adquirir mecanismos que les permitan adaptarse a la presencia de compuestos antibacterianos, mucho antes que comenzara la producción masiva de estos compuestos para prevenir y tratar enfermedades infecciosas (D'Costa et al., 2011). Hoy, prácticamente todos los antibióticos que han sido aprobados, independiente del origen que tengan, se enfrentan con bacterias resistentes. Esto sugiere que ambientes no-clínicos albergan bacterias con variación genética que otorgan resistencia para todos los antibióticos que se desarrollarán (Larsson & Flach, 2022). Asimismo, en ocasiones se ha evidenciado que microorganismos de ambientes no clínicos son originalmente los portadores de genes de resistencia que posteriormente migran y se transfieren hacia patógenos humanos (Potron et al., 2011). Un gen codificado en el cromosoma eventualmente se puede asociar, por ejemplo, a secuencias de inserción o *cassettes* genéticos dentro de un integrón, lo que potenciaría su movilización dentro del cromosoma, pero también hacia

elementos extracromosomales, otorgándole así la capacidad de transferirse entre bacterias y llegar a diversos ambientes (Larsson & Flach, 2022). Muchos de estos genes probablemente evolucionaron gradualmente desde genes que cumplían diferentes funciones en los microorganismos de origen (Andersson et al., 2015).

Dado que la movilización de bacterias y genes no tiene límites entre entornos y especies, es importante entender y reconocer las conexiones entre seres humanos, animales y ambiente. Los seres humanos interactúan constantemente con animales, donde no solo comparten el mismo entorno, sino que también enfermedades infecciosas (Zinsstag et al., 2012). Además, los antibióticos han sido ampliamente usados en agricultura, ganadería y acuicultura con el fin de prevenir y tratar enfermedades, sumado a su implementación como agentes promotores del crecimiento (Mann et al., 2021). Todas estas interacciones y evidencia han llevado a la aparición del concepto de “Una Salud” (*One Health*), un enfoque ampliamente usado no solo en el área de la resistencia a antibióticos, donde se promueve la interdisciplina para asegurar el bienestar humano, animal y del

medioambiente (McEwen & Collignon, 2018). Este enfoque posiciona la RA como una problemática multifactorial, donde las interfases humano, animal y ambiente coexisten y se interrelacionan.

Los antibióticos pueden llegar al ambiente a través de diferentes vías: excreciones humana y animal, mala eliminación de compuestos no usados, contaminación directa desde actividades productivas y corrientes que contienen residuos remanentes de la producción de estos compuestos, entre otros (Larsson & Flach, 2022). Modificaciones en ecosistemas por intervenciones o acciones humanas también afecta las dinámicas de la RA. El cambio climático, corrientes marinas y catástrofes naturales pueden generar modificaciones en la distribución y migración de comunidades microbianas, lo que incluye bacterias resistentes a antibióticos (Hernando-Amado, 2019). Además, las aves migratorias podrían estar jugando un rol importante en la diseminación de la RA entre diversos hábitats y regiones (Jarma et al., 2021).

“Una Salud” subraya la importancia de estudiar la RA más allá de la esfera de la salud humana. Sin embargo, el estudio de ambientes no-clínicos es un campo limitado en su desarrollo; la falta de definiciones básicas de una bacteria “susceptible” o “resistente” en el ambiente es uno de los grandes obstáculos que persisten, los que son criterios globales ya consensuados para bacterias de importancia clínica (Walsh, 2013). Por esta razón, resulta más fácil hablar de bacterias menos o más susceptibles a los efectos de un antibacteriano. A pesar de estas limitaciones, hay investigaciones que han planteado umbrales de 14 mm del halo de inhibición, en pruebas de susceptibilidad por difusión de disco, (Jara et al., 2020; Tomova et al., 2015), lo cual indicaría que bajo ese valor habría una mayor probabilidad de encontrar mecanismos de resistencia a antibióticos.

6. Ambientes extremos: el caso del Lago Chungará

La RA es un fenómeno transversal a diferentes ambientes, incluso en los más extremos. Ejemplo de esto es la Antártica, un territorio extremo y de difícil acceso, que pese a poseer una baja actividad antropogénica, ha demostrado ser reservorio de genes de resistencia (Jara et al., 2020; Rabbia et al., 2016; Yuan et al., 2019). En el Altiplano, se ha estudiado la RA en bacterias aisladas de animales como llamas y alpacas, así como también fuentes de agua y suelos (Archundia et al., 2017; Archundia et al., 2021; Guerrero-Olmos et al., 2014).

Con una altitud que sobrepasa los 4500 m.s.n.m, el Lago Chungará se posiciona como uno de los lagos de mayor altura a nivel mundial (Dorador et al., 2003). Este lago se ubica en la Región de Arica y Parinacota en Chile, cercano al límite fronterizo con Bolivia. Formado hace más de 10.000 años por una de las erupciones del volcán Parinacota, su principal afluente es el río Chungará, contando también con otros pequeños tributarios (Dorador et al., 2003; Guedron et al., 2019). Cuenta con una variedad de fauna, destacando la presencia de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), especie de salmónido introducido en Chile desde inicios del siglo XX. Se estima que la introducción de trucha al Lago Chungará puede haber ocurrido en la década de 1990

(González et al., 2024). Considerada una de las especies invasoras más dañinas a nivel mundial (Poorter et al., 2000), en el lago mantiene en constante peligro a *Orestias chungarensis*, también conocido como pez Karachi (SUBPESCA, 2015), especie endémica que forma parte de la dieta de la trucha arcoíris (González et al., 2024). En uno de los pequeños afluentes de lago habita otra especie endémica, el bagrecito del Chungará (*Trichomycterus chungaraensis*). Ambas especies se declararon vulnerables y están en peligro de extinción.



Figura 1 .- Imágenes de los peces que habitan el lago Chungará, el río Chungará y la vertiente Mal Paso. **A:** *Oncorhynchus mykiss*; **B:** *Orestias chungarensis*; **C:** *Trichomycterus chungaraensis*.

En noviembre del año 2022, el Núcleo Milenio de Salmónidos Invasores Australes (INVASAL) realizó una campaña en el Lago Chungará y alrededores. En esta campaña se colectaron muestras de *O. mykiss*, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis*, recolectando más de 80 muestras de hisopado del contenido intestinal. Los aislados recuperados de las muestras fueron sometidos a pruebas fenotípicas clásicas y de susceptibilidad a diversos antibióticos mediante prueba de difusión en agar, estudiando el comportamiento frente a 8 antibióticos de la familia de los betalactámicos (Figura 2) (Mardones, 2024). Se observaron halos de inhibición ≤ 14 mm frente a diferentes antibióticos betalactámicos, destacando ampicilina, cefalotina y cefuroxima. Esto demostró una susceptibilidad reducida a antibióticos betalactámicos en la microbiota intestinal estudiada de los peces que habitan este ecosistema extremo. Sin embargo, no se estudiaron los posibles mecanismos de resistencia asociados a esta baja susceptibilidad.

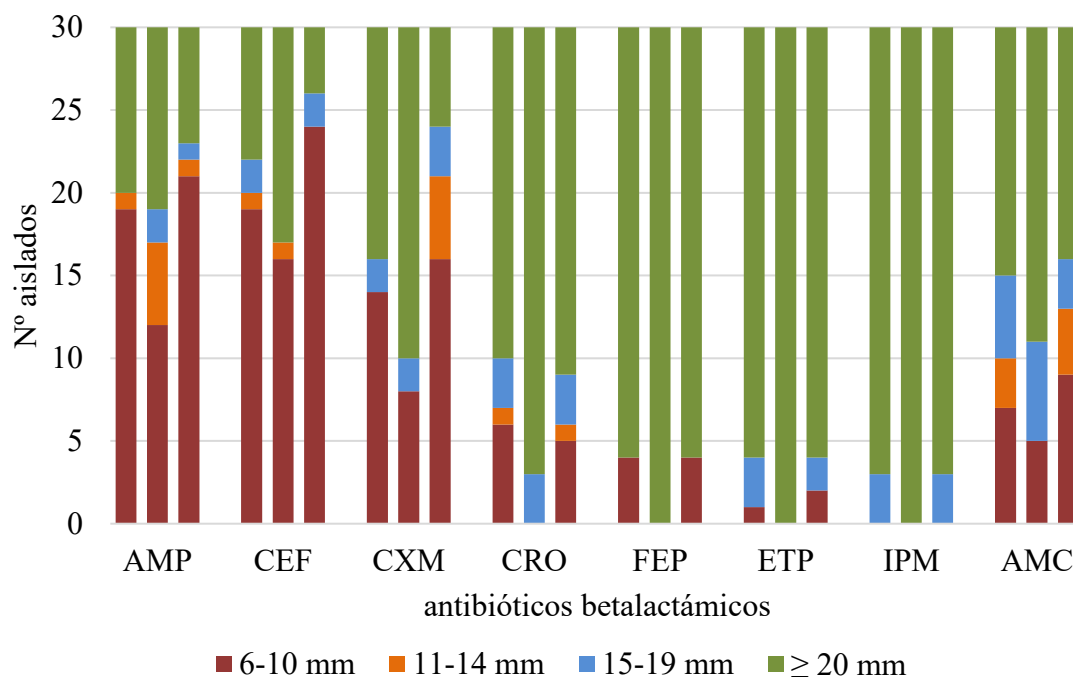


Figura 2 .- Distribución del diámetro de los halos de inhibición de antibióticos betalactámicos sobre 90 bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará: *O. mykiss* (primera columna), *O. chungarensis* (segunda columna) y *T. chungaraensis* (tercera columna). Los antibióticos usados fueron ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO), cefepima (FEP), ertapenem (ETP), imipenem (IPM), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Se plantean las siguientes preguntas de investigación considerando los perfiles de resistencia observados para antibióticos betalactámicos en bacterias aisladas desde intestino de peces nativos e introducidos del Lago Chungará, río Chungará y la vertiente Mal Paso:

- 1. ¿Existe producción de betalactamasas en aquellos aislados con halos de inhibición a betalactámicos menores o iguales a 14 mm?**
- 2. ¿Qué tipos de betalactamasas poseen estas cepas?**
- 3. ¿Cuál es la localización de los genes que codifican estas betalactamasas y cuál es el entorno genético de estos determinantes de resistencia?**

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las bacterias aisladas de intestino de peces endémicos e introducidos en el Lago Chungará, río Chungará y vertiente Mal Paso, que presentan halos de inhibición a betalactámicos menores o iguales a 14 mm, son productoras de betalactamasas, las cuales se encuentran codificadas en elementos genéticos móviles.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar las bacterias productoras de betalactamasas, identificar las betalactamasas y determinar la localización genética de los genes que las codifican, en bacterias aisladas del intestino de peces nativos e introducidos del Lago Chungará, río Chungará y vertiente Mal Paso.

Objetivos Específicos:

- Determinar la presencia de betalactamasas en bacterias aisladas desde intestino de peces del Lago Chungará, río Chungará y vertiente Mal Paso, que presentan halos de inhibición a betalactámicos menores o iguales a 14 mm.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de antibióticos betalactámicos en bacterias aisladas desde intestino de peces del Lago Chungará, río Chungará y vertiente Mal Paso
- Identificar las cepas productoras de betalactamasas aisladas desde intestino de peces del Lago Chungará, río Chungará y la vertiente Mal Paso
- Caracterizar el entorno genético de los genes que codifican para betalactamasas y compararlas entre bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, el río Chungará y vertiente Mal Paso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas para el desarrollo de esta tesis fueron obtenidas durante la campaña del Núcleo Milenio INVASAL al Lago Chungará, realizada en noviembre de 2022. Se tomaron muestras de hisopado intestinal de las tres especies de peces que habitan el lago Chungará, el río Chungará y la vertiente Mal Paso: trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), Karachi (*Orestias chungarensis*) y el bagrecito del Chungará (*Trichomycterus chungaraensis*). Las muestras fueron transportadas en torulas, con medio de transporte Stuart, el que favorece el mantenimiento de las bacterias, hasta las dependencias del LIAA. Brevemente, las torulas fueron suspendidas en suero fisiológico (NaCl 0,8% p/v) y fueron sembradas bajo distintas condiciones en agar R2A. Se aislaron colonias de diferentes morfotipos, los cuales fueron almacenados en el biorepositorio del LIAA a -80°C, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Se caracterizaron fenotípicamente distintos

aislados, para lo cual se realizaron pruebas de susceptibilidad a distintos antibióticos mediante antibiograma (Mardones, 2024).



Figura 3 .- Mapa del sitio de estudio. En la ampliación, el símbolo azul indica el lago Chungará, el símbolo naranja indica el río Chungará y el símbolo morado indica la vertiente Mal Paso.

1. Selección de cepas bacterianas

Para el desarrollo de esta tesis, se seleccionaron aquellos aislados que presentaran halos de inhibición, a alguno de los antibióticos betalactámicos empleados, menores o iguales a 14 mm. Las cepas fueron seleccionadas bajo este criterio considerando que halos menores o iguales a 14 mm indican una alta probabilidad de poseer mecanismos de resistencia (Jara et al., 2020). Para aquello se contaba con los perfiles de susceptibilidad a ocho antibióticos betalactámicos: ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO), cefepime (FEP), imipenem (IPM), ertapenem (EPT) y amoxicilina-ácido clavulánico (AMC). Estos aislados bacterianos se encontraban almacenados en el biorepositorio del LIAA a -80°C.

2. Detección fenotípica de betalactamasas

La detección de betalactamasas se llevó a cabo utilizando nitrocefina, una cefalosporina cromogénica sensible a la acción de estas enzimas (O'Callaghan et al., 1972). El ensayo se realizó según lo descrito por Montgomery y colaboradores con ciertas modificaciones (Montgomery et al., 1979). Se utilizó una solución de nitrocefina reconstituida según las recomendaciones del fabricante (Oxoid). Se depositaron colonias bacterianas en un portaobjetos de vidrio y sobre ellas 20 µl de la solución de nitrocefina, cuidando mantener el portaobjetos en un lugar húmedo para no deshidratar la solución. La reacción solo tarda algunos minutos, posterior a lo cual se observa un viraje de color amarillo a rojo cuando la nitrocefina es hidrolizada. Las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC-29213 y *S. aureus* ATCC-25923 fueron usadas como control positivo y negativo, respectivamente.

3. Detección fenotípica de BLEEs y AmpC

La identificación de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) y betalactamasas tipo AmpC se realizó con el método del disco combinado, el cual se basa en los métodos propuestos por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2013). Brevemente, las cepas se sembraron en presencia de cefalosporinas de tercera generación con y sin la presencia de ácido clavulánico, un inhibidor de un amplio rango de betalactamasas. Para la detección de betalactamasas tipo AmpC, las cuales no son inhibidas por ácido clavulánico, se empleó el uso de discos con cloxacilina, un antibiótico betalactámico que permite inhibir este grupo de enzimas. Se utilizó un kit para detección de BLEEs y AmpC (Liofilchem), según las instrucciones del fabricante con ciertas modificaciones. Las placas fueron sembradas en agar Mueller-Hinton e incubadas a 30°C entre 24 a 48 h hasta leer e interpretar los resultados. Las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC-700603 y *Escherichia coli* ATCC-25922 fueron usadas como cepas control para los ensayos de actividad antibacteriana.

4. Determinación de los niveles de resistencia a antibióticos

Los niveles de resistencia de las cepas (CMI, concentración mínima inhibitoria) se determinaron mediante el método de dilución seriada en agar para los siguientes antibióticos: AMP, CEF, CXM, CRO y FEP. Para esto, se suplementaron placas de agar Mueller-Hinton con los antibióticos en un rango de concentraciones entre 2,5-160 µg/ml. Las placas fueron inoculadas con ayuda de un replicador de Steers (Hanson & Martin, 1978), el cual permite trabajar simultáneamente con un máximo de 32 cepas. La incubación se realizó a 30°C entre 24 y 48 h, posterior a lo cual se leyeron e interpretaron los resultados. Para determinar la CMI de AMC y ETP, se realizó mediante prueba de epsilometría con reactivos de la marca Liofilchem y Biomérieux, respectivamente, según las recomendaciones del fabricante. La incubación se realizó a 30°C entre 24 y 48 h, posterior a lo cual se leyeron e interpretaron los resultados. La CMI corresponde a la concentración mínima del antibiótico

que se necesita para inhibir el desarrollo bacteriano. Las cepas *Escherichia coli* ATCC-25922, *Staphylococcus aureus* ATCC-29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853 y *Kocuria rhizophila* ATCC-9341 fueron usadas como cepas control para los ensayos de actividad antibacteriana.

5. Extracción de ADN bacteriano

La extracción del material genético se realizó con el uso de Chelex-100 (Bio-Rad) (de Lamballerie et al., 1992). Desde cultivo en medio sólido se seleccionaron colonias y se suspendieron en 200 µl de suero fisiológico (NaCl 0,8% p/v). Se centrifugó a 14.000 g por 1 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue suspendido en 100 µl de Chelex-100 al 5% p/v, incubando a 100°C por 10 min, posterior a lo cual se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración y pureza del ADN fue evaluada con el espectrofotómetro de

microplacas Take3 Epoch™, donde se midió la absorbancia a 260 y 280 nm y se calculó la relación 260/280.

6. Identificación molecular de las cepas

6.1 Amplificación del gen del ARNr 16S

La extracción se llevó a cabo según lo descrito anteriormente. El ADN extraído se usó como templado para la amplificación por PCR convencional de la región del ADN que codifica para el ARNr 16S. Se usaron los partidores universales P0 y P6 (Di Cello et al., 1997), los que generan un amplicón cercano a 1500 pb. Para esto se usó la enzima Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). Las

concentraciones y reactivos utilizados se pueden observar con mayor detalle en la Tabla 2. La amplificación por PCR se llevó a cabo en el termociclador MiniAmp™ Plus (Thermo Fisher Scientific) y el programa utilizado se observa en la Tabla S1. Los resultados fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v, en una corrida electroforética a 90 V por 1 h. La visualización y documentación de los resultados fue realizada con el transiluminador de luz UV (UVITEC).

Tabla 1.- Partidores utilizados para la amplificación del gen ARNr 16Ss mediante PCR.

Gen blanco	Partidores	Amplicón (pb)	Referencia
ARNr 16S	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CTACGGCTACCTTGTTACG	1533	Di cello et al., 1997

Tabla 2 .- Reactivos utilizados para la amplificación del gen ARNr 16s mediante PCR

Componentes	Volumen para 25 µl totales (µl)	Concentración final
Phusion Hot Start II DNA polymerase	0,25	0.02 U/µl
5X Phusion Green HF Buffer	5	1X
10 mM dNTPs	0,5	200 µM c/u
10 µM Primer Forward	1,25	0,5 µM

10 μ M Primer Reverse	1,25	0,5 μ M
Agua libre de nucleasa	16,15	-
Templado ADN	0,6	\approx 5 ng/ μ l

6.2 Secuenciación e identificación de las cepas

Los productos de amplificación fueron enviados a la compañía MacroGen Corp (Las Condes, Santiago, Chile) para su secuenciación por método Sanger. La identificación de las cepas se llevó a cabo a través de análisis bioinformáticos. Las secuencias obtenidas fueron trabajadas con ayuda de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para lo cual se realizó un alineamiento con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

7. Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR

Con el fin de establecer relaciones genéticas entre las cepas, se realizó ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*). Esta técnica se basa en la amplificación de secuencias intergénicas que se encuentran dentro del genoma bacteriano, lo que genera diversos patrones de amplificación, a partir de los cuales se puede discriminar entre distintas cepas (Versalovic et al., 1991). Se utilizaron los partidores ERIC1R y ERIC2 y la enzima GoTaq® Long (Promega) (Versalovic et al., 1991). Las concentraciones y reactivos utilizados se pueden observar en la Tabla 4. La amplificación por PCR se llevó a cabo en el termociclador MiniAmp™ Plus (Thermo Fisher Scientific) y el programa utilizado se observa en los anexos (Tabla S1) (Di Giovanni et al., 1999). Los resultados se observaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v, con una corrida electroforética a 80 V por 2,5 h. La visualización y documentación de los resultados fue realizada con el transiluminador de luz UV (UVITEC).

El análisis de los resultados se realizó a partir de los patrones de amplificación obtenidos, con el software GelJ (v2.0) (Heras et al., 2015). A partir de los resultados de ERIC-PCR se generaron dendrogramas , donde se incluyeron pasos de normalización para una comparación adecuada de los patrones de amplificación. Se utilizó el coeficiente de similitud de Dice, basado en bandas, y el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), con una tolerancia de 2%. Para los análisis las cepas fueron agrupadas según su identificación molecular, generando un dendrograma por género bacteriano. No se generaron dendrogramas para aquellos géneros bacterianos que estuvieran representados por menos de tres cepas.

Tabla 3.- Partidores utilizados para la amplificación de secuencias intergénicas mediante ERIC-PCR.

Gen blanco	Partidores	Amplicón (pb)	Referencia
------------	------------	---------------	------------

Regiones intergénicas	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	variable	Versalovic et al., 1991
--------------------------	---	----------	----------------------------

Tabla 4.- Componentes utilizados para llevar a cabo ERIC-PCR.

Componentes	Volumen para 20 μ l totales (μ l)	Concentración final
2X GoTaq® Long PCR Master Mix	10	1X
25 mM MgCl ₂	0,4	0,5 mM
25 μ M Primer Forward	0,8	1 μ M
25 μ M Primer Reverse	0,8	1 μ M
Agua libre de nucleasa	6	-
Templado ADN	2	\approx 20 ng/ μ l

8. Detección molecular de betalactamasas

La detección de genes que codifican betalactamasas en las cepas se llevó a cabo a través de PCR convencional. La extracción de ADN realizó según lo descrito anteriormente y el producto de extracción fue usado como templado para las amplificaciones. Se buscaron los siguientes genes de betalactamasas: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}. Los partidores utilizados se pueden observar en la Tabla 5. Para las amplificaciones se usó GoTaq®

G2 Green Master Mix (Promega) y las concentraciones con los reactivos empleados se pueden observar en la Tabla 6. Los programas de PCR se llevaron a cabo en el termociclador MiniAmp™ Plus (Thermo Fisher Scientific) y se pueden observar en la Tabla S1. Los resultados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% p/v, con una corrida electroforética a 90 V por 1 h. La visualización y documentación de los resultados fue realizada con el transiluminador de luz UV (UVITEC). El ADN de las cepas *Klebsiella pneumoniae* UCO-168 y *Enterobacter cloacae* UCO-186 se usaron como controles positivos en el caso de *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, respectivamente. La cepa *Escherichia coli* ATCC-25922 se usó como control negativo. Para *bla*_{AmpC}, se usó como control positivo al ADN de la cepa *Enterobacter cloacae* UCO-186 y como control negativo el de la cepa *K. pneumoniae* UCO-168. En el caso de los genes de la familia OXA, las cepas *Citrobacter freundii* C23, *K. pneumoniae* ATCC-700603 y *K. pneumoniae* Pf-69 fueron usadas como controles positivos para *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2} y *bla*_{OXA-10}, respectivamente, y la cepa *E. coli* ATCC-25922 como control negativo en todos los casos.

Tabla 5.- Partidores utilizados para la amplificación genes de betalactamasas mediante PCR.

Gen blanco	Partidores	Amplicón (pb)	Referencia
<i>bla</i> _{TEM}	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC TTATCCGCCTCCATCCAGTC	526	Tenover et al., 1994
<i>bla</i> _{SHV}	CTGGGGAAACGGAACCTGAATG GGGGTATCCCGCAGATAAAT	310	Sánchez et al., 2006
<i>bla</i> _{AmpC}	GGATTCCGGGTATGGCSGTNGC TCCCAGCCTARYCCCTGRTACAT	745	Stock et al., 2003
<i>bla</i> _{OXA-1}	ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	814	Steward et al., 2001
<i>bla</i> _{OXA-2}	CCTGCATCGACATTCAAGATA CTCAACCCATCCTACCCACCA	468	Vignolo et al., 2006
<i>bla</i> _{OXA-10}	CGTGCTTTGTAAAAGTAGCAG CATGATTTTGGTGGGAATGG	652	Steward et al., 2001

Tabla 6.- Componentes utilizados la amplificación de genes de betalactamasas mediante PCR.

Componentes	Volumen para 10 µl totales (µl)	Concentración final
2X GoTaq® Green Master Mix	5	1X
25 µM Primer Forward	0,1	0,25 µM
25 µM Primer Reverse	0,1	0,25 µM
Agua libre de nucleasa	3,8	-
Templado ADN	1	≈ 20 ng/µl

9. Secuenciación de genoma completo

9.1 Selección de cepas

La selección de las cepas se realizó teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos anteriormente, para lo cual se contaba con pruebas fenotípicas y de carácter molecular. Además, se buscó seleccionar cepas provenientes del intestino de las tres especies de peces (*O. mykiss*, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis*) y a la vez de distintos ejemplares de cada especie.

9.2 Extracción de ADN bacteriano y secuenciación

La extracción del material genético de las cepas seleccionadas se llevó a cabo con el uso del DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN) según las recomendaciones y el protocolo proporcionado por el fabricante.

Los productos de la extracción fueron enviados para su secuenciación a través de plataforma Illumina a la empresa SeqCenter (Pittsburgh, Pensilvania, USA). Las bibliotecas de las muestras fueron preparadas utilizando el kit Illumina DNA Prep y la secuenciación se llevó a cabo con el equipo de secuenciación Illumina NovaSeq X Plus, obteniendo lecturas de 2x151 pb. La demultiplexación, control de calidad y recorte de adaptadores se realizaron con bcl-convert (v4.2.4), como parte de los servicios de secuenciación de la empresa.

9.3 Análisis bioinformáticos

Los resultados de secuenciación de genoma completo fueron procesados y analizados con diversas herramientas bioinformáticas, las cuales en su mayoría se encontraban en la plataforma Galaxy Australia, que alberga más de 1000 herramientas de libre acceso. En primer lugar, se realizó un control de calidad de las secuencias con la herramienta FASTQC (Galaxy v0.74). El ensamble se realizó con la herramienta Shovill (Galaxy v1.1.0), utilizando los algoritmos SPAdes y SKESA. El asesoramiento del ensamble se realizó con la herramienta QUAST (Galaxy v5.3.0), que entrega parámetros generales del ensamble como el total de *contigs*, N50, y contenido GC (Gurevich et al., 2013). La identificación de las cepas se realizó con la herramienta JSpeciesWS (v4.2.1), que compara los genomas ingresados contra los genomas de la base de datos, la cual alberga más de 65.000 genomas (Richter et al., 2016). Para complementar la identificación, también se utilizó la plataforma pubMLST, la cual realiza la identificación bacteriana mediante rMLST (*ribosomal Multilocus Sequence Typing*) (Jolley et al., 2018). Posterior a la identificación se utilizaron las herramientas CheckM (Galaxy

v1.2.3) y fastANI (Galaxy v1.3) para evaluar la completitud de los genomas, su posible contaminación y similitud con genomas de referencia (Jain et al., 2018; Parks et al., 2015). La anotación de los genes se realizó con la herramienta Bakta (v1.10.4) (Schwengers et al., 2021). Con el fin de identificar genes de resistencia, se empleó la herramienta ABRicate, con un porcentaje mínimo de identificación y cobertura de 70% (Galaxy v1.0.1). Esta herramienta bioinformática cuenta con distintas bases de datos para realizar la identificación de genes, no solo de resistencia a antibióticos, sino que también para la identificación de factores de virulencia y genes de resistencia a biocidas, entre otros. Para el análisis de genes de resistencia se empleó la base de datos del NCBI. Con el fin de complementar los resultados obtenidos, específicamente para el caso de los genes codificantes de betalactamasas, se utilizó la Beta-Lactamase DataBase (BLDB), la cual corresponde a una base de datos curada (Naas et al., 2017). Para esto, se trabajó con los archivos correspondientes a la anotación funcional de genes, donde se buscaron todas las secuencias anotadas como betalactamasas, posterior a lo cual se realizó un alineamiento en base a las secuencias de aminoácidos en la base de datos. La búsqueda e identificación de plásmidos se llevó a cabo con las herramientas PlasmidFinder (Galaxy v2.1.6) y Mobrecon (Galaxy v3.0.3) (Carattoli &

Hasman, 2020). La detección de integrones se realizó con la herramienta Integron Finder (Galaxy v2.0.5) (Neron et al., 2022).

10. Análisis estadístico

Se construyó una matriz binaria en base a la presencia o ausencia de los genes de resistencia identificados en cada una de las cepas para compararlas usando estadística multivariada. Se realizó un Análisis de Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) en *RStudio* v4.3.2. Para comparar los resultados entre los distintos géneros bacterianos identificados y la especie de pez de la cual provenían las cepas, se realizó un análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) en *RStudio* v4.3.2.

RESULTADOS

1. Cepas de trabajo

Del total de 90 cepas analizadas, 71 presentaron halos de inhibición menores o iguales a 14 mm frente a al menos uno de los antibióticos betalactámicos evaluados en las pruebas de susceptibilidad. El 34% de las cepas (N = 24) provenían del intestino de *O. mykiss*, las cuales fueron aisladas de 9 muestras de hisopado intestinal de trucha arcoíris distintas. Las cepas aisladas de *O. chungarensis* representaron un 27% del total (N = 19), recuperadas de 9 ejemplares. Por último, un 39% de las cepas (N = 28) provenían del intestino de *T. chungaraensis*, las que fueron recuperadas del intestino de 10 ejemplares. Los datos de los peces se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7.- Tamaño y peso de los ejemplares de peces del Lago Chungará, Chile.

	Tamaño (cm)		Peso (g)	
	Rango	Promedio	Rango	Promedio
<i>O. mykiss</i>	[10,5 - 61,7]	33,4	[14,0 - 3170,0]	1086,8
<i>O. chungarensis</i>	[6,9 - 10,9]	8,8	[4,0 - 17,0]	9,7
<i>T. chungaraensis</i>	[5,1 - 15,5]	10,3	[1,0- 29,0]	10,9

2. Detección fenotípica de betalactamasas

Solo una cepa presentó un resultado negativo a la prueba de nitrocefina, de un total de 71 aislados estudiados. Esta cepa fue aislada del intestino de un ejemplar de *O. mykiss*.

En el caso de la detección de BLEEs y betalactamasas tipo AmpC, 13 cepas presentaron halos de inhibición menores o iguales a 14 mm a CRO. Siete cepas fueron aisladas del intestino de ejemplares de *O. mykiss* y 6 de *T.*

chungaraensis, mientras que ninguna cepa aislada de *O. chungarensis* presentó esta característica. Los resultados se pueden observar en la Tabla 8. Todas las cepas de *O. mykiss* presentaron fenotipo AmpC positivo, mientras que esto se dio solo en el 86% (6) de las cepas de *T. chungaraensis*. No hubo detección fenotípica de BLEEs. Una cepa, proveniente del intestino de *T. chungaraensis* y positiva al test de nitrocefina, presentó resultados que no permitieron clasificar la betalactamasa como BLEE ni de tipo AmpC, por lo que fue informada como negativa para ambos fenotipos estudiados.

Tabla 8.- Total de cepas productoras de betalactamasas tipo AmpC y BLEEs.

	Especie de pez	
	<i>O. mykiss</i> (N= 7)	<i>T. chungaraensis</i> (N= 6)
Fenotipo AmpC positivo	7	5
Fenotipo BLEE positivo	-	-

3. Niveles de resistencia a antibióticos

Se observó que sobre el 70% de las cepas estudiadas presentaron CMIs superiores a 160 µg/ml para el caso de AMP (40/57) y CEF (47/61), que fue la concentración máxima empleada en los ensayos de susceptibilidad. Por otro lado, se observaron CMIs superiores a 160 µg/ml en el 67% de las cepas para CXM (29/43) y CRO (8/12). En el caso de FEP, el 43% de las cepas presentó CMIs superiores a 160 µg/ml, correspondiendo a 3/7 cepas estudiadas. Para ETP el 100% (3/3) de las cepas estudiadas presentó CMIs mayores a 32 µg/ml, y en el caso de AMC el 68% (19/28) presentó CMIs mayores a 256:128 µg/ml, concentraciones máximas de antibióticos en las pruebas de epsilometría empleadas, respectivamente.

En el caso de las cepas aisladas del intestino de *O. mykiss*, 18 presentaron halos de inhibición menores o iguales a 14 mm a AMP, con concentraciones mínimas inhibitorias mayores a 20 µg/ml en todas ellas, y 15/18 presentaron CMIs mayores a 160 µg/ml, la máxima concentración utilizada. Con respecto a las cefalosporinas, se empleó CEF en 20 cepas, obteniendo 18/20 con CMIs mayores a 160 µg/ml, mientras que las restantes se distribuyeron entre CMIs de 40 µg/ml y 160 µg/ml. Para CXM, las 14 cepas estudiadas presentaron

CMI's mayores a 40 µg/ml, obteniendo 9/14 cepas con CMI's mayores a 160 µg/ml y 4/14 CMI's de 160 µg/ml, dejando solo una cepa con CMI de 80 µg/ml. En el caso de CRO y FEP, que contaban con una menor cantidad de cepas con susceptibilidad reducida, de igual manera se obtuvo cepas con CMI's superiores a 160 µg/ml, 4/6 en el caso de CRO y 1/3 para FEP. La prueba de epsilometría se empleó en 10 cepas para AMC, de las cuales 7/10 presentaron CMI superior al máximo determinado por la prueba (256:128 µg/ml), mientras que las restantes se distribuyeron entre CMI's de 16:8 µg/ml, 24:12 µg/ml y 64:32 µg/ml. Solo una cepa presentó susceptibilidad reducida a ETP, y la CMI determinada para este antibiótico fue superior a 32 µg/ml.

Con respecto a las cepas aisladas del intestino de *O. chungarensis*, de las 17 cepas con susceptibilidad reducida a AMP, solo 6/17 presentaron CMI's mayores a 160 µg/ml, las demás se distribuyeron desde CMI's de 5 µg/ml hasta 160 µg/ml. En el caso de las cefalosporinas los resultados presentaron menor variación. Para CEF, en 18/20 cepas se obtuvieron CMI's mayores a 160 µg/ml. Con respecto a CXM, las 14 cepas estudiadas presentaron CMI's superiores a 80 µg/ml, obteniendo 9/14 con resultados superiores a 160 µg/ml.

Para AMC, se observó que 4/5 cepas estudiadas presentaron CMI superiores a 256:128 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de CRO, FEP y ETP, no se aislaron cepas con halos de inhibición menores o iguales a 14 mm.

Por último, para las cepas del intestino de *T. chungaraensis*, las 22 cepas con susceptibilidad reducida a AMP presentaron CMIs mayores a 40 $\mu\text{g/ml}$ y 19/22 CMIs mayores a 160 $\mu\text{g/ml}$. Para las 24 cepas estudiadas se observaron CMIs de CEF mayores a 20 $\mu\text{g/ml}$, obteniendo 16/24 con resultados mayores a 160 $\mu\text{g/ml}$. Con respecto a CXM, 12/21 cepas presentaron CMIs mayores a 160 $\mu\text{g/ml}$ y el resto de las cepas se encontraron CMIs superiores a 40 $\mu\text{g/ml}$. En el caso de CRO y FEP, solo se aisló 6 y 4 cepas con susceptibilidad reducida para cada compuesto, respectivamente. De estos, 4/6 y 2/4 presentaron CMIs superiores al máximo empleado para CRO y FEP, respectivamente. En el caso de las pruebas epsilométricas, se emplearon en 13 cepas para el caso de AMC, dentro de las cuales se determinó CMI superior a 256:128 $\mu\text{g/ml}$ en 8 de ellas. En el caso de ETP se estudió en 2 cepas, las cuales presentaron CMI superior a 32 $\mu\text{g/ml}$.

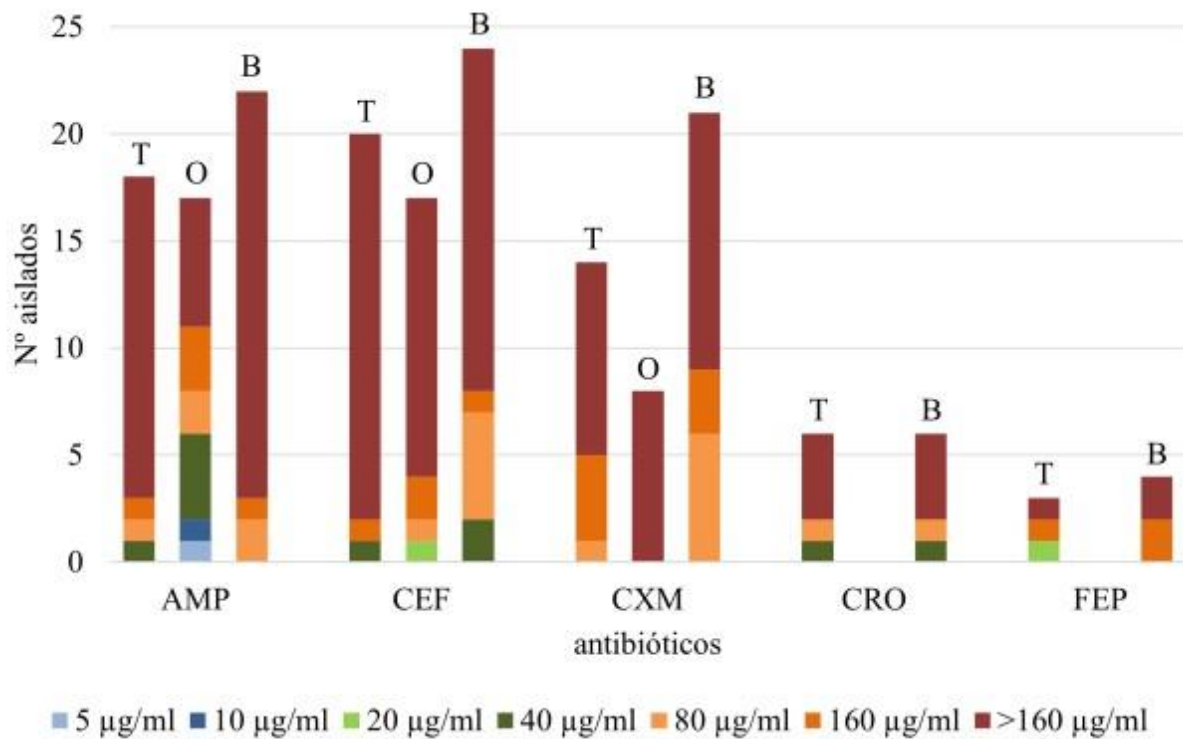


Figura 4 .- Distribución de la concentración mínima inhibitoria de antibióticos betalactámicos en bacterias aisladas del intestino de *O. mykiss* (T), *O. chungarensis* (O) y *T. chungaraensis* (B) del Lago Chungará, Chile. Ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO) y cefepima (FEP).

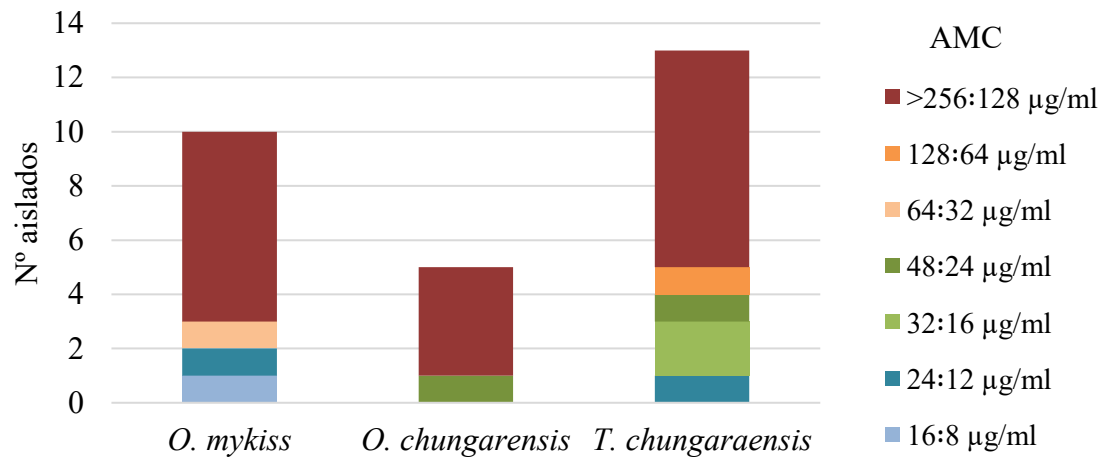


Figura 5 .- Distribución de la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina-ácido clavulánico (2:1) (AMC) en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

4. Identificación molecular de las cepas

Se logró identificar molecularmente la mayoría de las 71 cepas estudiadas, con excepción de cinco cepas: dos correspondieron a cepas del intestino de *O. mykiss*, una cepa de *O. chungarensis* y dos de *T. chungaraensis* (Tabla 9 y

Figura 6). Se logró identificar cepas pertenecientes a ocho géneros bacterianos, siendo *Pseudomonas* el género predominante. En el caso de las cepas aisladas de intestino de *O. mykiss*, los géneros bacterianos predominantes fueron *Pseudomonas* (6/24), *Serratia* (5/24) y *Aeromonas* (5/24). Para las cepas aisladas de *O. chungarensis*, se observó que sobre el 50% de ellas correspondieron al género *Pseudomonas* (10/19), mientras que el segundo género con mayor representación fue *Aeromonas*, con 4/19 del total de cepas. Por último, en el caso de las cepas aisladas del intestino de *T. chungaraensis*, los tres géneros predominantes fueron *Pseudomonas* (8/28), *Rahnella* (6/28) y *Serratia* (4/28). Si bien la mayoría de las cepas correspondían a bacterias Gram negativas, y más específicamente bacilos Gram negativos, también se lograron identificar aquellas bacterias Gram positivas, correspondiendo principalmente a la especie *Carnobacterium maltaromaticum*. En comparación con las cepas aisladas del intestino de *O. mykiss* y *T. chungaraensis*, se observó una menor diversidad bacteriana en las cepas aisladas del intestino de *O. chungarensis*.

Tabla 9.- Identificación molecular de los aislados de intestino de peces del Lago Chungará, Chile, mediante secuenciación del gen del ARNr 16S.

Género	N° aislados (%)		
	<i>O. mykiss</i>	<i>O. chungarensis</i>	<i>T. chungaraensis</i>
<i>Serratia</i> spp.	5 (21%)	2 (11%)	4 (14%)
<i>Carnobacterium</i> spp.	2 (8%)	-	3 (11%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	6 (25%)	10 (53%)	8 (29%)
<i>Yersinia</i> spp.	1 (4%)	-	1 (4%)
<i>Shewanella</i> spp.	2 (8%)	2 (11%)	-
<i>Aeromonas</i> spp.	5 (21%)	4 (21%)	3 (11%)
<i>Rahnella</i> spp.	1 (4%)	-	6 (21%)
<i>Paenibacillus</i> spp.	-	-	1 (4%)
Sin identificar	2 (8%)	1 (5%)	2 (7%)
Total	24	19	28

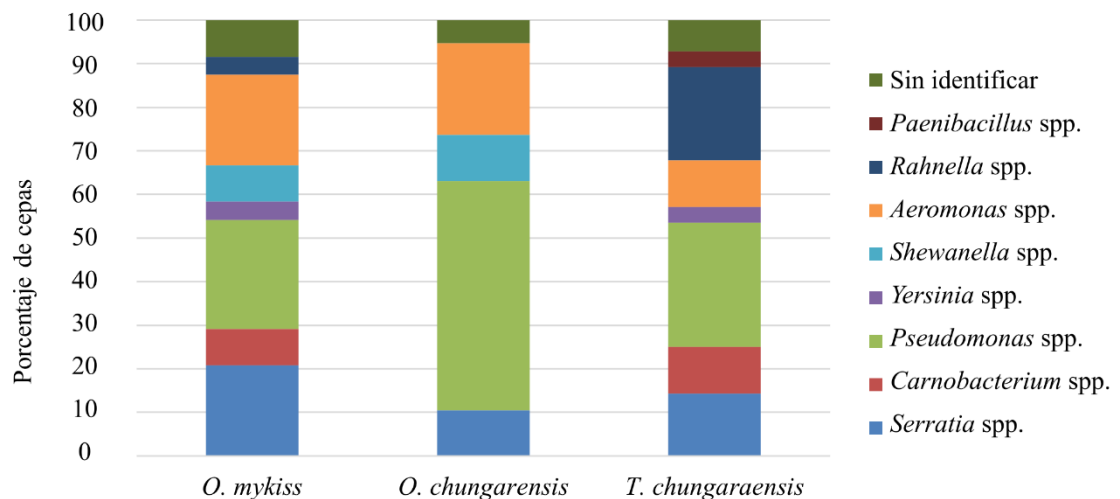


Figura 6.- Distribución de los aislados según la identificación molecular en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, mediante secuenciación del gen del ARNr 16S.

5. Relación genética de las cepas

Los géneros *Yersinia* y *Paenibacillus*, además de aquellas cepas que no pudieron ser identificadas, fueron excluidas del análisis, esto debido al bajo número de cepas identificadas en cada género. El género *Carnobacterium* también fue excluido debido a una pobre amplificación con el programa utilizado. Se observaron cepas que compartían el mismo patrón de

amplificación de bandas al amplificar con partidores adecuados para ERIC-PCR, lo que se tradujo en un 100% de similitud en los dendrogramas (Figuras 8-12).

Como resultado general, en la mayoría de los casos se observaron cepas con altos porcentajes de similitud, es decir, cepas relacionadas genéticamente, provenientes de una misma especie de pez. En el caso del género *Aeromonas* (Figura 7), esto se observó en 4 grupos: las cepas 314-315 (*O. chungarensis*), 258-71-67 (*T. chungaraensis*), 230-74 (*O. chungarensis*) y 184-181 (*O. mykiss*). En el género *Serratia* (Figura 8), también se observó la formación de 4 grupos con altos niveles de relación genética: 228-153 (*O. chungarensis*), 308-300-252-251 (*T. chungaraensis*), 195-381 (*O. mykiss*) y 98-95 (*O. mykiss*). Solo se observaron dos agrupaciones con 100% de similitud para el género *Rahnella* (Figura 9), correspondiendo a las cepas 310-303 y 65-69, todas aisladas de *T. chungaraensis*. Las cepas 199-94 (*O. mykiss*), identificadas como *Shewanella* sp. (Figura 10), compartieron el mismo patrón de bandas. Por último, el caso del género *Pseudomonas* (Figura 11), el cual contaba con la mayor cantidad de cepas, se generaron solo 3 agrupaciones con un 100% de similitud: 122-121 (*O. mykiss*), 126-125 (*O. chungarensis*) y 298-295 (*T. chungaraensis*).

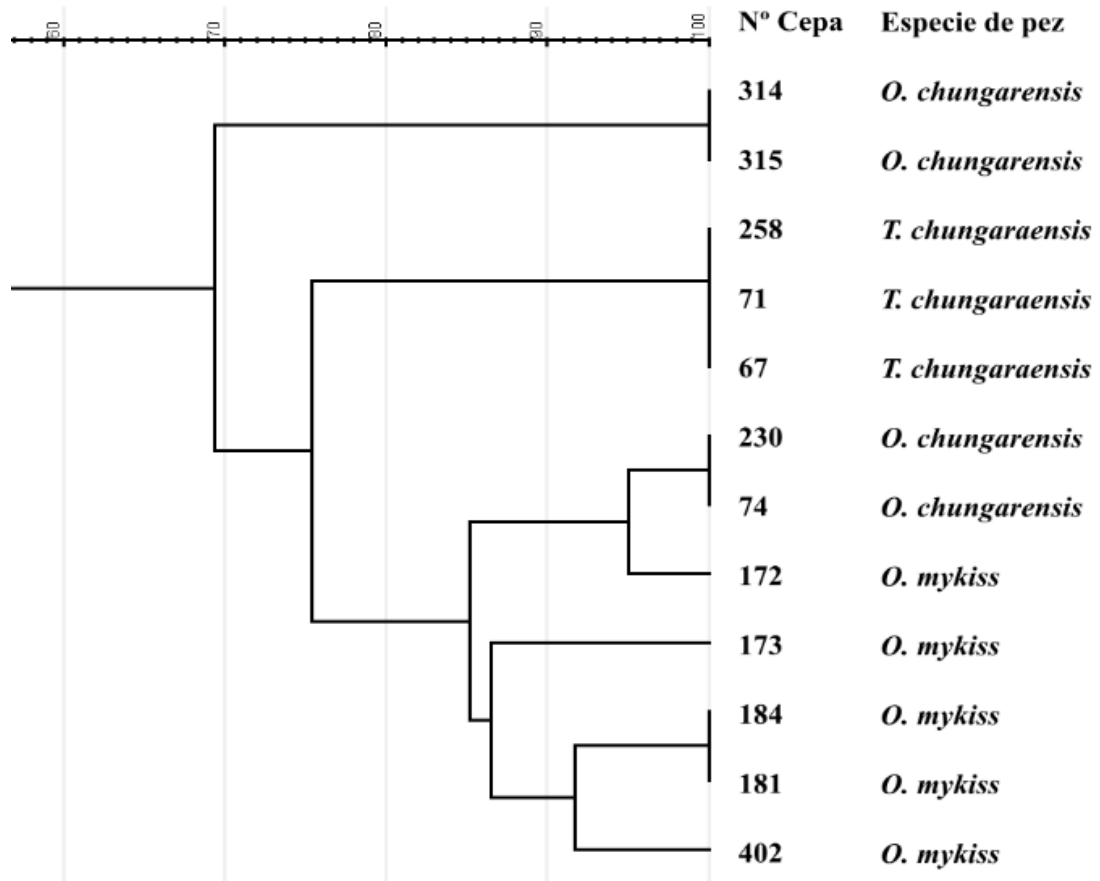


Figura 7.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género *Aeromonas* aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

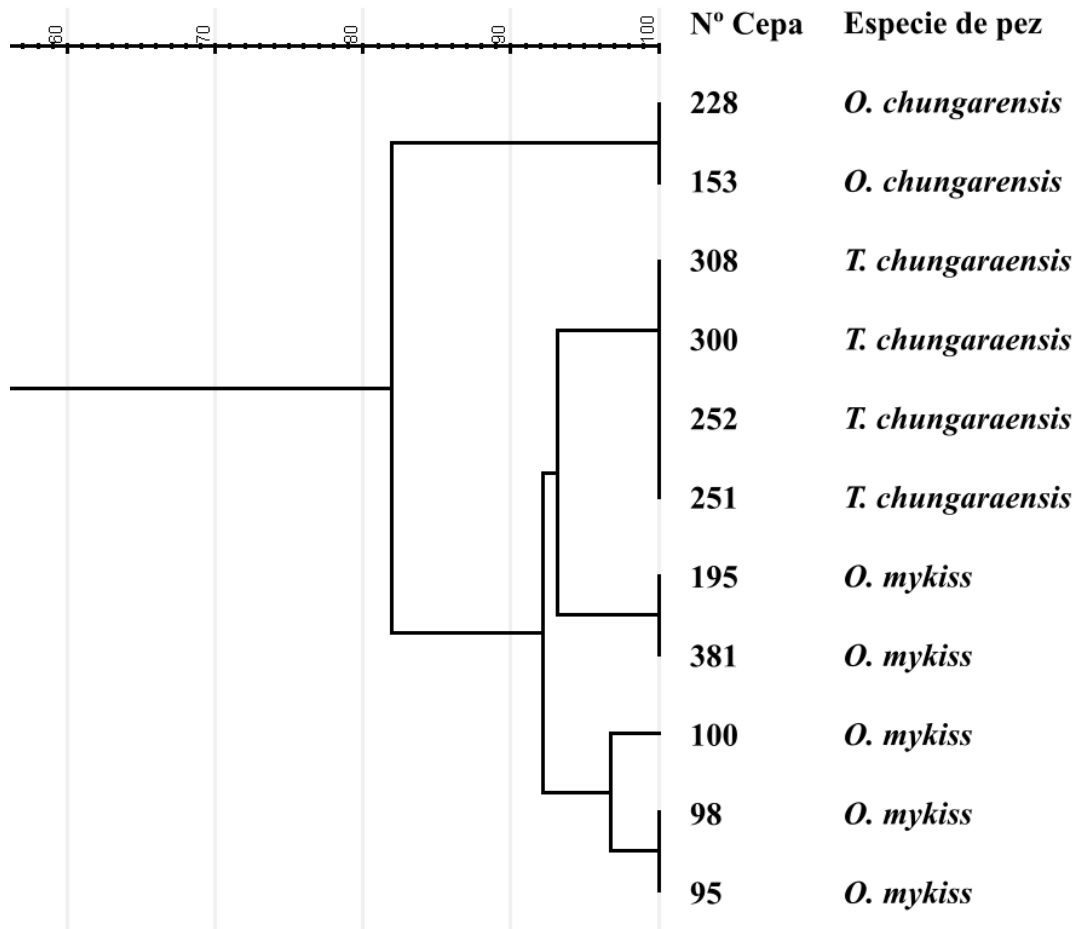


Figura 8.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género *Serratia* aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

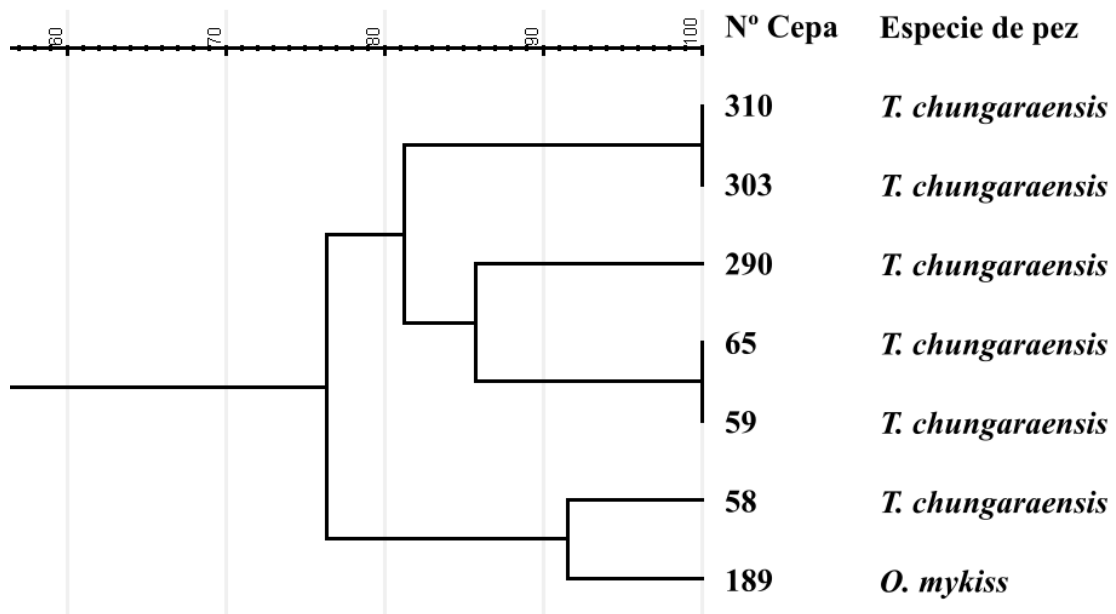


Figura 9.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género *Rahnella* aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

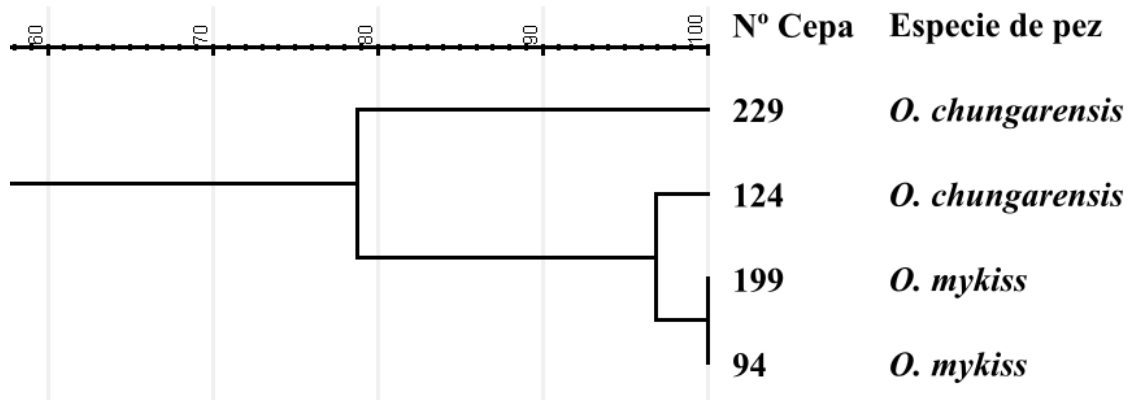


Figura 10.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género *Shewanella* aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

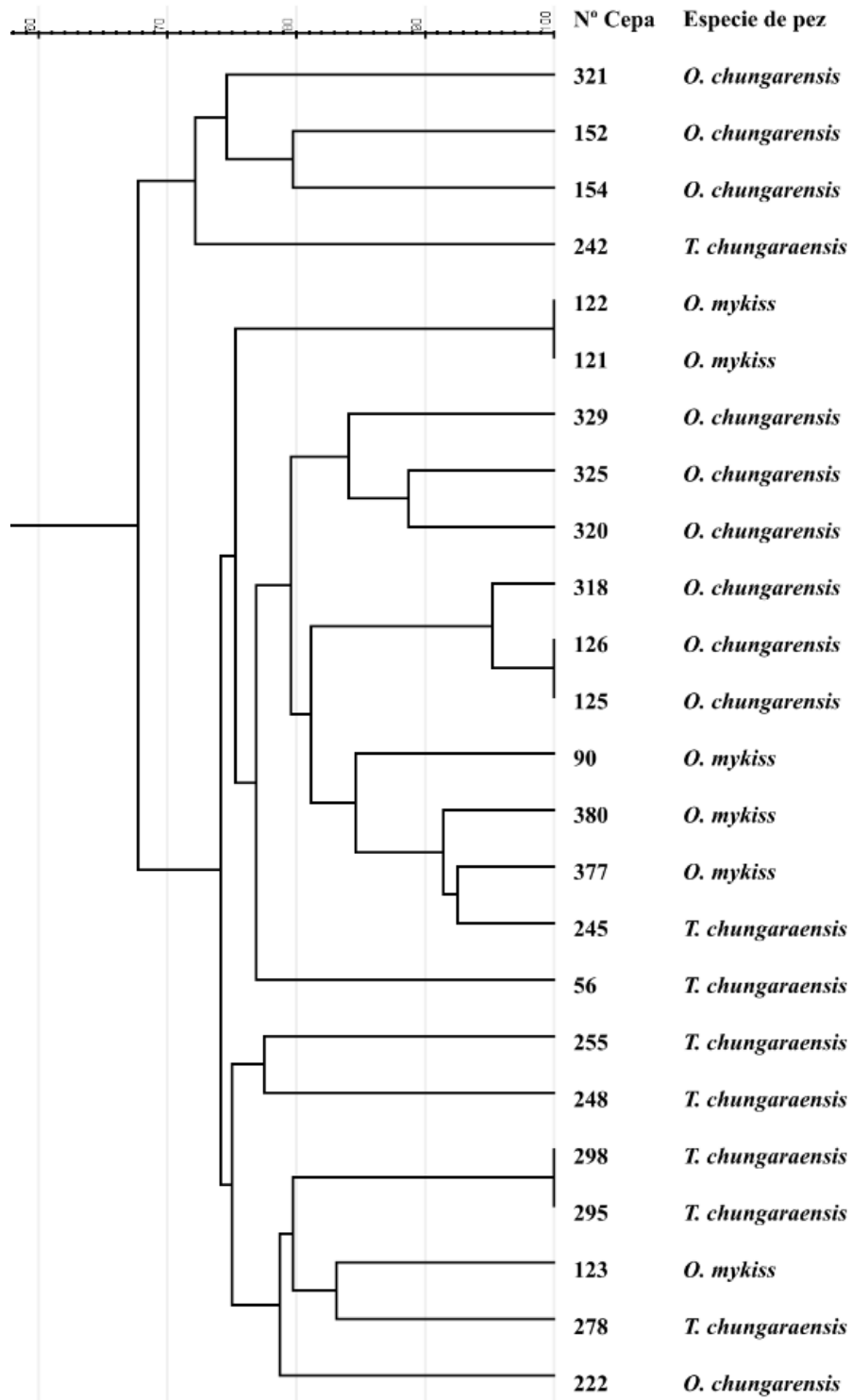


Figura 11.- Análisis de relación genética mediante ERIC-PCR de cepas del género *Pseudomonas* aisladas de intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

6. Detección molecular de betalactamasas

La detección de betalactamasas centrada en los genes codificantes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10} no reveló amplificación para ninguno de los genes pesquisados usando PCR convencional.

7. Secuenciación de genoma completo

7.1 Selección de cepas

Se seleccionaron 20 cepas, teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, que se sometieron a secuenciación de genoma completo: ocho cepas provenientes del intestino de *O. mykiss*, cuatro de *O. chungarensis* y ocho de *T. chungaraensis* (Tabla 10). La selección se basó en: 1) producción de betalactamasas, teniendo en cuenta las CMIs obtenidas de antibióticos betalactámicos; y 2) diferencias a nivel molecular, excluyendo aquellas cepas altamente relacionadas genéticamente según los dendrogramas obtenidos, cuidando seleccionar cepas provenientes del intestino de los tres grupos de estudio (*O. mykiss*, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis*).

Tabla 10.- Selección de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, para someter a secuenciación de genoma completo.

N° Cepa	Especie de pez	ID 16S	CMI (µg/ml)						
			AMP	CEF	CXM	CRO	FEP	ETP	AMC
71	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	>160	>160	-	-	-	-	-
254	<i>T. chungaraensis</i>	No identificada	>160	>160	80	-	-	-	48/24
100	<i>O. mykiss</i>	<i>Serratia</i> sp.	>160	>160	160	-	-	-	-
251	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia</i> sp.	>160	>160	>160	-	-	-	>256/128
189	<i>O. mykiss</i>	<i>Rahnella</i> sp.	40	40	-	-	-	-	-
314	<i>O. chungarensis</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	>160	>160	-	-	-	-	-
88	<i>O. mykiss</i>	<i>Yersinia</i> sp.	160	160	-	-	-	-	>256/128
173	<i>O. mykiss</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	>160	>160	-	-	-	-	16/8
65	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella</i> sp.	160	80	80	-	-	-	-
310	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella</i> sp.	>160	80	80	-	-	-	-
82	<i>O. mykiss</i>	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	-	>160	>160	>160	-	-
272	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	-	160	>160	>160	-	-
248	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	>160	>160	>160	40	-	>32	>256/128
187	<i>O. mykiss</i>	No identificada	>160	>160	80	-	-	-	64/32
90	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	>160	>160	>160	80	5	>32	>256/128
121	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	>160	>160	>160	>160	-	-	>256/128
125	<i>O. chungarensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	>160	>160	>160	-	-	-	>256/128
331	<i>O. chungarensis</i>	No identificada	160	160	-	-	-	-	>256/128
242	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	>160	>160	>160	>160	-	>32	>256/128
153	<i>O. chungarensis</i>	<i>Serratia</i> sp.	80	>160	>160	-	-	-	-

Ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefuroxima (CXM), ceftriaxona (CRO), cefepima (FEP), ertapenem (ETP) y amoxicilina-ácido clavulánico (AMC).

Los resultados del control de calidad de los ensamblajes se observan en la Tabla 11. Con respecto al número total de *contigs* obtenidos, lo mínimo obtenido fue 22, mientras que el máximo fue 187, con un promedio de 76 *contigs*. El largo total de los ensamblajes también fue variado, obteniendo un máximo de 8,41 Mpb y un mínimo de 3,43 Mpb. El contenido de guanina y citosina (%GC) de los genomas varió entre 34% y 61%, reflejando variaciones en la composición genómica de las cepas analizadas. Con respecto a los estadísticos N50 y N90, que corresponden a la longitud donde se encuentra el 50% y 90% de los *contigs*, respectivamente, se observaron valores variables nuevamente. En el caso del N50, se obtuvieron resultados desde 57.126 pb hasta 763.592 pb, con una media de 296.808 pb, mientras que para el N90, estos valores correspondieron a 16.083 pb, 200.952 pb y 80.107 pb, respectivamente.

Tabla 11.- Reporte de calidad de los ensambles de genoma completo de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

Nº Cepa	Especie de pez	Nº contigs	Largo total (Mpb)	N50 (pb)	N90 (pb)	L50	L90	GC (%)
71	<i>T. chungaraensis</i>	37	4,86	265.034	71.577	6	21	59,67
254	<i>T. chungaraensis</i>	102	5,89	235.314	47.004	9	30	54,81
100	<i>O. mykiss</i>	122	6,27	156.955	29.356	13	50	53,28
251	<i>T. chungaraensis</i>	125	6,18	109.223	35.280	18	53	53,5
189	<i>O. mykiss</i>	27	5,36	763.592	155.633	3	11	53,34
314	<i>O. chungarensis</i>	23	4,57	408.345	119.659	4	11	59,08
88	<i>O. mykiss</i>	52	5,1	216.605	92.442	7	22	47,85
173	<i>O. mykiss</i>	53	4,77	205.033	46.136	8	29	58,6
65	<i>T. chungaraensis</i>	53	5,7	236.874	86.841	8	23	52,28
310	<i>T. chungaraensis</i>	35	5,66	454.074	116.186	5	15	52,21
82	<i>O. mykiss</i>	22	3,43	332.468	142.211	4	11	34,36
272	<i>T. chungaraensis</i>	66	3,94	201.180	43.752	7	23	34,14
248	<i>T. chungaraensis</i>	24	8,41	614.552	200.952	5	13	61,44
187	<i>O. mykiss</i>	50	5,04	737.018	71.915	2	9	52,55
90	<i>O. mykiss</i>	170	7,05	68.972	24.026	31	101	60,27
121	<i>O. mykiss</i>	38	6,79	361.459	159.091	5	16	60,18
125	<i>O. chungarensis</i>	113	6,84	132.229	39.007	19	52	60,15
331	<i>O. chungarensis</i>	47	5,47	309.225	80.083	7	20	53,98
242	<i>T. chungaraensis</i>	187	6,44	70.888	16.083	26	100	60,17
153	<i>O. chungarensis</i>	166	5,03	57.126	16.383	28	85	55,34

7.2 Identificación bacteriana

Con el fin de poder identificar las cepas que fueron secuenciadas, se empleó la herramienta *JSpeciesWS*, resultados que se observan en la Tabla 12. Esta herramienta entrega resultados de Z-Score, el cual puede ir del 0 al 1. Valores bajo 0,989 son considerados bajos, mientras que entre 0,989 y 0,999 se consideran buenos y sobre 0,999 muy buenos. En algunos casos la identificación de las cepas se informó solo a nivel de género bacteriano. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 12, donde se puede observar que en la mayoría de los casos se llegó a una identificación a nivel de especie, los cuales contaban con un porcentaje de soporte superior al 90%, a excepción de 4 cepas. En el caso de la cepa 71, identificada como *Aeromonas piscicola* se obtuvo un soporte del 81%, mientras que en el caso de las cepas 121 y 125, identificadas como *Pseudomonas grimontii* se obtuvieron soportes de 50% y 52%, respectivamente, y la cepa 248 contó con soportes de tan solo 25% para cuatro especies diferentes de *Pseudomonas*, las cuales correspondieron a

Pseudomonas chlororaphis, *Pseudomonas emilianonis*, *Pseudomonas helvética* y *Pseudomonas yamanorum*.

Para complementar estos análisis, se utilizó la herramienta FastANI, la cual se basa en el cálculo de identidad de nucleótidos promedio (ANI), resultados que se encuentran en la Tabla 13. Considerando que el punto de corte para poder asociar las cepas a una especie en particular se encuentra cercano al 95%, se puede observar que en la mayoría de los casos la identificación se corresponde con los resultados obtenidos a partir del análisis de rMLST. Sin embargo, en el caso de la cepa 248 se puede observar que los resultados de fastANI no superan el 87% y son similares para las distintas especies que fueron analizadas.

Tabla 12.- Identificación de las cepas secuenciadas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, obtenido con JSpeciesWS.

Nº Cepa	Especie de pez	JSpeciesWS
71	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
254	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia</i> sp.
100	<i>O. mykiss</i>	<i>Serratia fonticola</i>
251	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia fonticola</i>

189	<i>O. mykiss</i>	<i>Rahnella</i> sp.
314	<i>O. chungarensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
88	<i>O. mykiss</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
173	<i>O. mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>
65	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella</i> sp.
310	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella</i> sp.
82	<i>O. mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
272	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
248	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
187	<i>O. mykiss</i>	<i>Lelliottia amnigena</i>
90	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
121	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
125	<i>O. chungarensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
331	<i>O. chungarensis</i>	<i>Erwinia</i> sp.
242	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
153	<i>O. chungarensis</i>	<i>Serratia</i> sp.

Tabla 13.- Identificación de las cepas secuenciadas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, obtenido con pubMLST y fastANI.

Nº Cepa	Especie de pez	pubMLST (% soporte)	fastANI (%)
71	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Aeromonas piscicola</i> (81%)	97,66
		<i>Aeromonas bestiarum</i> (9%)	95,54
		<i>Aeromonas salmonicida</i> (9%)	91,84
254	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia quinivorans</i> (100%)	94,89
100	<i>O. mykiss</i>	<i>Serratia fonticola</i> (100%)	95,52
251	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia fonticola</i> (100%)	95,53
189	<i>O. mykiss</i>	<i>Rahnella rivi</i> (94%)	98,16
		<i>Rahnella sikkimica</i> (3%)	85,71
314	<i>O. chungarensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> (100%)	97,42

88	<i>O. mykiss</i>	<i>Yersinia intermedia</i> (100%)	97,86
173	<i>O. mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> (97%)	97,05
		<i>Aeromonas bestiarum</i> (2%)	91,68
65	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i> (98%)	99,33
310	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i> (98%)	99,41
82	<i>O. mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (100%)	98,68
272	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> (100%)	98,76
248	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (25%)	86,66
		<i>Pseudomonas emilianonis</i> (25%)	84,37
		<i>Pseudomonas helvetica</i> (25%)	84,60
		<i>Pseudomonas yamanorum</i> (25%)	84,21
187	<i>O. mykiss</i>	<i>Lelliottia amnigena</i> (93%)	93,65
90	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas yamanorum</i> (100%)	94,58
121	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas grimontii</i> (52%)	94,01
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (17%)	88,14
		<i>Pseudomonas sivasensis</i> (17%)	89,80
125	<i>O. chungarensis</i>	<i>Pseudomonas grimontii</i> (50%)	94,32
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (16%)	94,59
		<i>Pseudomonas quebecensis</i> (16%)	88,04
		<i>Pseudomonas sivasensis</i> (16%)	89,75
331	<i>O. chungarensis</i>	<i>Erwinia rhapontici</i> (100%)	98,62
242	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas edaphica</i> (100%)	98,37
153	<i>O. chungarensis</i>	<i>Serratia proteamaculans</i> (100%)	97,14

La herramienta CheckM fue utilizada para evaluar la completitud y contaminación de los genomas, resultados que se observan en la Tabla 14. Cabe destacar que este análisis se puede realizar en base a las diferentes unidades taxonómicas, tomando como referencia un set específico de genes. Para las cepas seleccionadas, se utilizó como unidad taxonómica el género bacteriano, debido a que no se contaba con genomas correspondientes a las

especies que fueron identificadas previamente, y en tres casos no se contaba con el género correspondiente, por lo que el análisis se realizó a nivel de familia. De los 20 genomas analizados, 19 presentaron un alto nivel de completitud, siendo estos superiores al 90%, y solo una cepa presentó un porcentaje de completitud menor (89,99%). Con respecto a la contaminación, se pueden clasificar en diferentes rangos: cuando el porcentaje de contaminación es $\leq 5\%$ se clasifica como bajo, entre 5% y $\leq 10\%$ es medio, entre 10% y $\leq 15\%$ se considera como alto y mayor al 15% muy alto. Teniendo en cuenta estos valores, 16/20 cepas presentaron niveles de contaminación bajos, alcanzando incluso un 0% en una muestra. Por otro lado, 3/20 cepas presentaron niveles de contaminación medios, mientras que una muestra presentó un alto nivel de contaminación ($10,36\%$). En relación a lo anterior, las dos muestras que presentaron los mayores porcentajes de contaminación correspondieron a aquellas identificadas como *Carnobacterium maltaromaticum*, las cuales solo pudieron ser analizadas con respecto a su completitud y contaminación a nivel de familia, ya que no se contaba con genomas representativos de la especie ni género bacteriano correspondientes.

Tabla 14.- Análisis de completitud y contaminación de genomas de cepas aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

N° Cepa	Especie de pez	Completitud (%)	Contaminación (%)
71	<i>T. chungaraensis</i>	99,75	1,04
254	<i>T. chungaraensis</i>	99,95	1,41
100	<i>O. mykiss</i>	99,86	2,52
251	<i>T. chungaraensis</i>	99,86	2,1
189	<i>O. mykiss</i>	89,99	4,4
314	<i>O. chungarensis</i>	99,93	0,59
88	<i>O. mykiss</i>	99,36	1,52
173	<i>O. mykiss</i>	99,59	1,15
65	<i>T. chungaraensis</i>	96,26	3,63
310	<i>T. chungaraensis</i>	96,43	3,21
82	<i>O. mykiss</i>	98,22	9,97
272	<i>T. chungaraensis</i>	98,22	10,36
248	<i>T. chungaraensis</i>	100	5,68
187	<i>O. mykiss</i>	100	0
90	<i>O. mykiss</i>	99,92	0,24
121	<i>O. mykiss</i>	100	0,75
125	<i>O. chungarensis</i>	99,89	1,15
331	<i>O. chungarensis</i>	97,59	7,67
242	<i>T. chungaraensis</i>	100	0,83
153	<i>O. chungarensis</i>	99,98	0,68

7.3 Anotación de genes

La anotación de los genes se realizó con la herramienta Bakta, y los resultados que se encuentran en la Tabla 15. En general, se puede observar que las

secuencias codificantes (CDS) varían entre 3000 y 8000. Además, se identificaron distintos tipos de ARNs, dentro de los cuales encontramos ARN de transferencia (ARNt), importantes en la síntesis proteica, los cuales variaron entre 59 y 123, los ARN ribosomales (ARNr), componentes importantes del ribosoma, que variaron entre 3 y 11, y los ARN no codificantes (ARNnc), que no codifican para proteínas pero se relacionan con diferentes procesos biológicos, los cuales variaron entre 11 y 73. Asimismo, se identificaron entre 1 a 2 orígenes de replicación (*oriC*) en los genomas analizados, y solo se identificaron en 2 cepas orígenes de transferencia (*oriT*), los que juegan un rol importante en la transferencia horizontal de genes.

Tabla 15.- Anotación funcional de genes en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

N° Cepa	Especie de pez	tRNA	tmRNA	rRNA	ncRNA	ncRNA regions	CRISPR	CDS	sORF	oriC	oriT
71	<i>T. chungaraensis</i>	93	2	7	18	36	0	4386	3	1	0
254	<i>T. chungaraensis</i>	78	1	11	60	52	3	5642	6	2	0
100	<i>O. mykiss</i>	77	1	4	53	48	3	5775	8	2	0
251	<i>T. chungaraensis</i>	79	1	9	47	47	0	5690	8	2	0
189	<i>O. mykiss</i>	68	1	5	40	40	1	4845	8	2	0
314	<i>O. chungarensis</i>	99	1	8	15	30	0	4160	3	1	0
88	<i>O. mykiss</i>	79	1	8	56	55	0	4694	7	1	1
173	<i>O. mykiss</i>	92	1	7	17	31	0	4344	2	1	0
65	<i>T. chungaraensis</i>	64	1	3	49	45	0	5298	7	1	0
310	<i>T. chungaraensis</i>	66	1	5	46	41	0	5235	7	1	0
82	<i>O. mykiss</i>	65	1	6	11	47	0	3126	0	1	0
272	<i>T. chungaraensis</i>	67	1	10	14	44	4	3623	0	1	0
248	<i>T. chungaraensis</i>	123	2	6	61	41	0	7766	3	1	0
187	<i>O. mykiss</i>	73	1	4	67	52	2	4781	12	2	1
90	<i>O. mykiss</i>	63	1	6	59	42	0	6432	2	2	0
121	<i>O. mykiss</i>	59	1	8	46	50	0	6166	2	1	0
125	<i>O. chungarensis</i>	65	1	4	49	39	0	6357	2	2	0
331	<i>O. chungarensis</i>	77	1	5	39	66	0	5074	8	2	0
242	<i>T. chungaraensis</i>	66	1	6	73	42	0	5760	1	1	0
153	<i>O. chungarensis</i>	73	1	6	51	46	0	4726	8	2	0

7.4 Identificación de genes de resistencia

Se utilizaron porcentajes de identidad y cobertura de un mínimo de 70% para definir las secuencias codificantes (o marcos de lectura abierto) como potenciales genes de resistencia a antibióticos. Como se puede observar en la Tabla 16, en las cepas provenientes de las tres especies de peces se identificaron genes codificantes de diferentes mecanismos de resistencia. Además de los genes de resistencia a antibióticos betalactámicos, se identificaron genes de resistencia a otras familias de antibióticos como polimixinas, quinolonas, fenicoles, tetraciclinas, estreptograminas y fosfomicina en distintas cepas.

En la Tabla 17 se pueden observar los resultados según los diferentes géneros bacterianos identificados previamente. En las cepas del género *Serratia*, se identificaron 4 familias distintas de betalactamasas pertenecientes a enzimas de clase A, B y C. Asimismo, se identificaron genes involucrados en la protección del sitio blanco, de resistencia a tetraciclinas y bombas de

expulsión. En el caso del género *Aeromonas*, las cepas resultaron ser portadoras de genes codificantes de betalactamasas clase B, C y D, así como también genes *mcr*, que codifican un mecanismo de resistencia a colistina. Por otra parte, se identificaron genes de betalactamasas de clase A en las tres cepas del género *Rahnella*, las cuales además portan genes de resistencia a tetraciclinas y bombas de expulsión. En el caso de las especies de *Pseudomonas*, se identificaron genes de betalactamasas clase C y genes involucrados en la hidrólisis de fosfomicina. Para la cepa de *Yersinia intermedia*, se logró identificar un gen codificante de betalactamasas clase A, además de genes de resistencia a tetraciclina y estreptogramina. A través de la metodología utilizada, no se lograron identificar secuencias de betalactamasas en la cepa 331, identificada como *Erwinia* sp., y solo se identificó un gen de resistencia a tetraciclinas. En el caso de la cepa identificada como *Lelliottia* sp. se identificó un gen codificante para una betalactamasa de clase C, así como genes de resistencia a estreptogramina y tetraciclina. Por último, en el caso de las cepas Gram positivas, solo se identificaron betalactamasas de clase C; sin embargo, estas no pudieron ser reconocidas por la base de datos utilizada, y las secuencias fueron extraídas de la anotación funcional de genes.

Tabla 16.- Genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según especie de pez, identificados con ABRicate.

Mecanismo de resistencia		Gen de resistencia	Nº aislados pesquisados por especie de pez		
			<i>O. mykiss</i>	<i>O. chungarensis</i>	<i>T. chungarae</i>
Inactivación del antibiótico	Hidrólisis	<i>bla_{FOX}</i>	1	1	1
		<i>bla_{OXA}</i>	1	1	1
		<i>bla_{CphA}</i>	1	1	1
		<i>bla_{AmpC}</i>	-	1	1
		<i>bla_{ACT}</i>	2	-	1
		<i>bla_{FONA}</i>	1	-	1
		<i>bla_{CTX-M}</i>	1	-	-
		<i>bla_A</i>	1	-	-
		<i>bla_{RAHN}</i>	-	-	2
		<i>bla_{PDC}</i>	2	1	2
	<i>bla_{SPR}</i>	-	1	-	
	Acetiltransferasas	<i>vat(F)</i>	3	-	-
	Glutación S-transferasas	<i>fosA</i>	-	-	1
Modificación del sitio blanco	Fosfoetanolamina transferasas	<i>mcr</i>	1	1	2
Bombas de expulsión		<i>oqxA</i>	2	1	3
		<i>oqxB</i>	2	1	3
Protección del sitio blanco		<i>qnrE</i>	1	1	2
		<i>qnrB</i>	-	1	-
Otros		<i>tet(34)</i>	6	2	2

Tabla 17.- Genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según el género bacteriano, identificados con ABRicate.

Mecanismo de resistencia		Gen de resistencia	N° aislados pesquisados por género bacteriano								
			<i>Serratia spp.</i>	<i>Aeromona s spp.</i>	<i>Rahnella a spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Yersinia spp.</i>	<i>Erwinia spp.</i>	<i>Lelliottia spp.</i>	<i>Carnobacterium spp.</i>	
Inactivación del antibiótico	Hidrólisis	<i>bla_{FOX}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	
		<i>bla_{OXA}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	
		<i>bla_{CphA}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	
		<i>bla_{AmpC}</i>	2	-	-	-	-	-	-	2	
		<i>bla_{ACT}</i>	2	-	-	-	-	-	1	-	
		Betalactamasas	<i>bla_{FONA}</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
		<i>bla_{CTX-M}</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	
		<i>bla_A</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	
		<i>bla_{RAHN}</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	
		<i>bla_{PDC}</i>	-	-	-	5	-	-	-	-	
		<i>bla_{SPR}</i>	1	-	-	-	-	-	-		
		Acetiltransferasas	<i>vat(F)</i>	-	-	1	-	1	-	1	-
		Glutación S-transferasas	<i>fosA</i>	-	-	-	1	-	-	-	-
Modificación del sitio blanco	Fosfoetanolamina transferasas	<i>mcr</i>	-	4	-	-	-	-	-	-	-
Bombas de expulsión		<i>oqx_A</i>	2	-	3	-	-	-	1	-	
		<i>oqx_B</i>	2	-	3	-	-	-	1	-	
Protección del sitio blanco		<i>qnr_E</i>	4	-	-	-	-	-	-	-	
		<i>qnr_B</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	
Otros		<i>tet(34)</i>	4	-	3	-	1	1	1	-	

Además, se utilizó la base de datos BLDB (Beta-Lactamase DataBase) para complementar la identificación de las secuencias codificantes de betalactamasas, resultados que se observan en la Tabla 18 y Tabla 19. Se lograron identificar betalactamasas en todas las cepas secuenciadas, las cuales correspondieron a enzimas de clase A, B, C y D.

Tabla 18.- Genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según especie de pez, identificados con BLDB.

Gen de betalactamasa	N° aislados pesquisados por especie de pez		
	<i>O. mykiss</i>	<i>O. chungarensis</i>	<i>T. chungaraensis</i>
<i>bla_{FOX}</i>	1	1	1
<i>bla_{OXA}</i>	1	1	1
<i>bla_{CphA}</i>	1	1	1
<i>bla_{AmpC}</i>	-	1	1
<i>bla_{ACT}</i>	2	-	1
<i>bla_{FONA}</i>	1	-	1
<i>bla_{CTX-M}</i>	1	-	-
<i>bla_A</i>	1	-	-
<i>bla_{RAHN}</i>	-	-	2
<i>bla_{PDC}</i>	2	1	2
<i>bla_{SPR}</i>	-	1	-

Tabla 19.- Genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, según género bacteriano, identificados con BLDB.

Gen de betalactamasa	N° aislados pesquisados por género bacteriano							
	<i>Serratia</i> spp.	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Rahnella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Erwinia</i> spp.	<i>Lelliottia</i> spp.	<i>Carnobacterium</i> spp.
<i>bla_{ASA-3}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{OXA}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{CphA}</i>	-	3	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{SPC}</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{SFDC}</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{FONA}</i>	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>bla_{SMO}</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>bla_A</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>bla_{YEC}</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>bla_{RAHN}</i>	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>bla_{CAD}</i>	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>bla_{PFL}</i>	-	-	-	5	-	-	-	-
<i>bla_{LAQ}</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>bla_{ERH}</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>bla_{SPR}</i>	1	-	-	-	-	-	-	-

7.5 Identificación de elementos genéticos móviles

Con el fin de identificar algunos elementos genéticos móviles (EGMs) se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas. En el caso de plásmidos, se utilizaron las herramientas Plasmidfinder y MOBRecon, mientras que para integrones se utilizó Integronfinder.

Se identificaron secuencias de origen plasmídico en 6 cepas, las cuales fueron reconocidas a través MOBRecon, y solo en un caso también con el uso de Plasmidfinder. Los resultados se muestran en la Tabla 20, donde se puede observar el tamaño de los plásmidos identificados y la predicción del tipo de movilidad que presentan, entre otras características. Con respecto a estas cepas, se identificó solo un plásmido en cada una de ellas, las cuales además corresponden a 6 géneros bacterianos: *Serratia*, *Rahnella*, *Yersinia*, *Lellittia*, *Pseudomonas* y *Erwinia*. Con respecto a la distribución de estas cepas según la especie de pez de la cual fueron aisladas, tres de estas provienen del

intestino de *O. mykiss*, dos del intestino de *O. chungarensis* y una del intestino de *T. chungaraensis*, y a la vez todas ellas fueron recuperadas de muestras intestinales de distintos ejemplares. Cabe mencionar que en ninguno de estos plásmidos se identificaron genes de resistencia a antibióticos. Interesantemente, en dos cepas se identificaron plásmidos de características similares, los cuales compartían gran parte de su estructura, destacando además que estas cepas se aislaron de dos especies de peces diferentes (*O. mykiss* y *O. chungarensis*). En ninguna cepa se identificó integrones.

Tabla 20.- Contigs asociados a secuencias de plásmidos identificados en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

Nº Cepa	Especie de pez	Nº contigs	Largo (pb)	Contenido GC (%)	Movilidad
254	<i>T. chungaraensis</i>	1	32369	49,48	Conjugativo
189	<i>O. mykiss</i>	1	5021	49,59	Movilizable
88	<i>O. mykiss</i>	1	3869	44,28	No movilizable
187	<i>O. mykiss</i>	5	201578	44,22	Conjugativo
125	<i>O. chungarensis</i>	6	132403	56,68	Conjugativo
331	<i>O. chungarensis</i>	1	5437	49,14	Movilizable

8. Análisis estadísticos

Para analizar los datos obtenidos a partir de la secuenciación de genoma completo se llevaron a cabo análisis estadísticos. En primer lugar, se compararon los resultados en base a las diferentes betalactamasas identificadas con la base de datos BLDB, lo que se observa en la Figura 12. En los resultados se puede observar que las cepas se distribuyen según el género bacterianos (colores); sin embargo, no se observó algún patrón entre las diferentes especies de peces (formas). A través del análisis estadístico realizado se observaron diferencias significativas entre géneros bacterianos ($p=0,000999$) pero no entre especie de pez ($p= 0,985$).

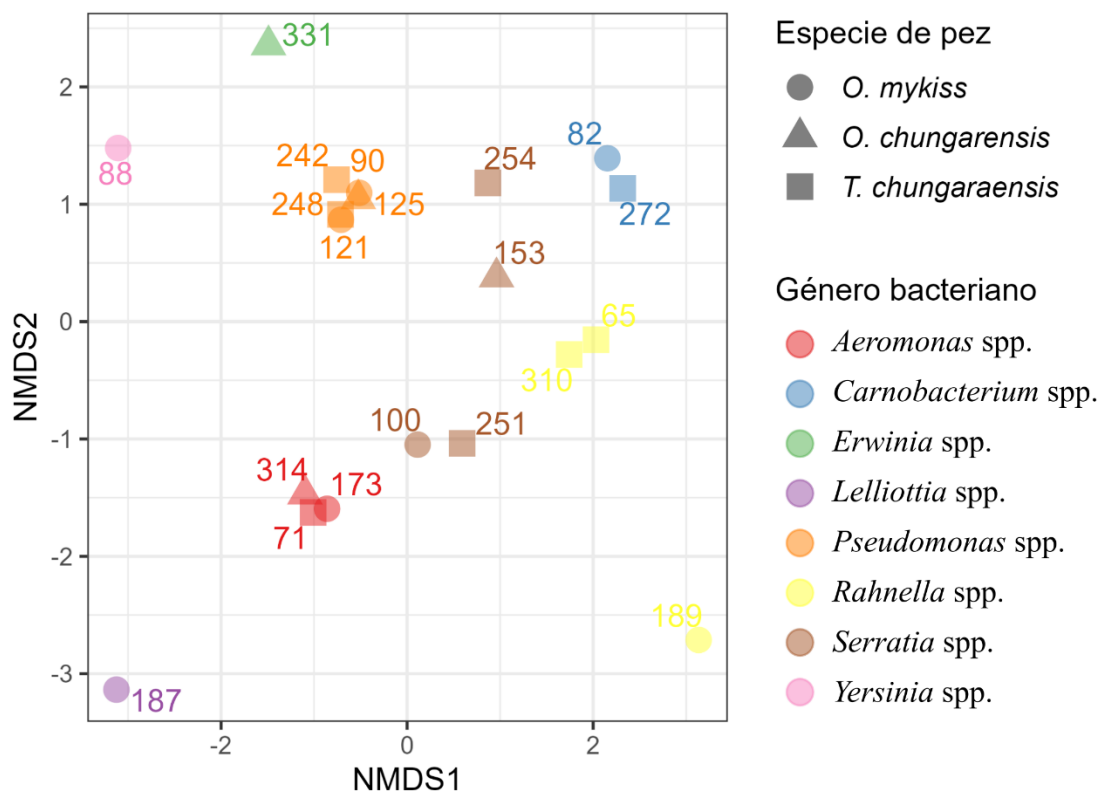


Figura 12.- Análisis de Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) basado en la detección de genes codificantes de betalactamasas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile. Cada símbolo representa una cepa distinta, identificada con un número.

En segundo lugar, se llevó a cabo el análisis teniendo en cuenta todos los genes de resistencia identificados anteriormente, manteniendo, en el caso de las betalactamasas, los resultados obtenidos a través de la base de datos BLDB. En la Figura 13, se observa que las cepas correspondientes a

Carnobacterium, *Aeromonas* y *Pseudomonas* se agrupan solo entre ellas y por separado, mientras que los demás géneros se agrupan todos juntos. No se observan patrones de agrupamiento para el caso de la especie de pez. El PERMANOVA arrojó nuevamente diferencias significativas entre género bacteriano ($p=0,000999$), pero no entre las tres especies de pez de las cuales provenían las cepas ($p=0,983$).

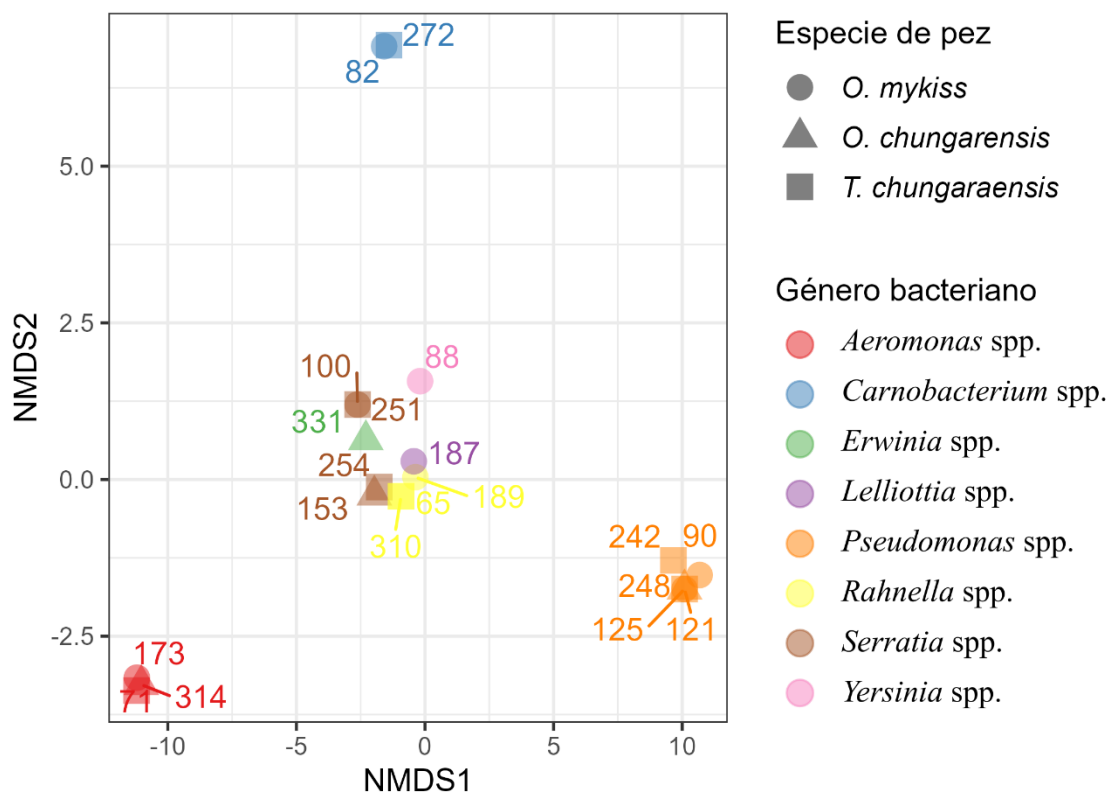


Figura 13.- Análisis de Escalamiento Multidimensional No Paramétrico (NMDS) basado en la detección de genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile. Cada símbolo representa una cepa distinta, identificada con un número.

DISCUSIÓN

En esta tesis se trabajó con 71 aislados bacterianos provenientes del intestino de tres especies de peces que habitan el Lago Chungará, el río Chungará y la vertiente Mal Paso. Las muestras fueron obtenidas a partir de hisopados intestinales realizados en noviembre del año 2022. A diferencia de los estudios de RA realizados en clínica humana o veterinaria, en ambientes no clínicos no existe una definición clara del concepto de resistencia en estos ambientes, lo que deriva en la ausencia de puntos de corte para diferenciar aislados susceptibles, intermedios o resistentes. Para este trabajo se estableció un parámetro previamente definido, y que establece que aquellos aislados que en el antibiograma presentan halos de inhibición menores o iguales a 14 mm tienen una mayor probabilidad de poseer mecanismos de resistencia (Jara et al., 2020). Todas las cepas estudiadas presentaban, según estudios previos, halos de inhibición menores o iguales a 14 mm a por lo menos un antibiótico de la familia de los betalactámicos.

1. Detección fenotípica de betalactamasas

Utilizando la prueba de hidrólisis de la nitrocefina, se pudo determinar que más del 98% de las cepas seleccionadas evidenció la producción de una betalactamasa. Esta prueba permite la detección rápida de este tipo de enzimas y, en la mayoría de los casos, sirve como resultado predictor de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos; sin embargo, no necesariamente será indicativo de un fenotipo resistente. Si bien, gran parte de los estudios se centran en entornos clínicos, en los cuales se han estudiado y caracterizado cientos de familias y variantes de betalactamasas, estas no son enzimas que se reduzcan solo a este tipo de ambiente. Un ejemplo de esto son las betalactamasas de la familia CTX-M, las cuales tienen su origen en *Kluyvera* spp., género bacteriano de Enterobacterales, comúnmente asociado al ambiente (Cantón et al., 2012). Además, se ha descrito que diversas bacterias ambientales podrían estar actuando como reservorio de genes de resistencia,

incluyendo betalactamasas (Lupo et al., 2022). A través del método del disco combinado, se logró detectar la presencia de betalactamasas tipo AmpC en 12 cepas, mientras que no se observó producción de BLEEs en ninguna de ellas. Considerando que el kit utilizado tiene como objetivo detectar este tipo de enzimas principalmente en aislados clínicos, no es extraño que en una de las cepas los resultados no hayan sido concluyente, para determinar qué tipo de betalactamasa producía. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente con nitrocefina, el método del disco combinado se ensayó en menos de un 20% del total de aislados. Esto debido a los espectros de actividad del tipo de enzimas, para lo cual solo se seleccionaron aquellos aislados con halos de inhibición menores o iguales a 14 mm para la cefalosporina de tercera generación ceftriaxona. Recordando que el punto de corte utilizado considera una probabilidad, es posible que otras cepas hayan sido portadoras de enzimas tipo AmpC y/o BLEEs y no hayan sido pesquisadas. Además, la prueba de nitrocefina permite detectar un rango mucho más diverso de betalactamasas, y por lo tanto esto podría indicar que las demás cepas son portadoras de betalactamasas de un menor espectro de actividad.

2. Niveles de resistencia a antibióticos

En el caso de la determinación de CMI, se observó un alto porcentaje de cepas con niveles superiores al máximo ensayado para distintos antibióticos. Si bien al igual que con el método de difusión en discos no existe un punto de corte para definir cepas susceptibles y resistentes, mientras mayor sea la CMI menor será la susceptibilidad al compuesto ensayado. En todos los casos, la menor cantidad de aislados ensayados correspondió a aquellos provenientes del intestino de *O. chungarensis*. Esta tendencia podría estar indicando que la microbiota intestinal estudiada de esta especie de pez es más susceptible a antibióticos betalactámicos en comparación con la de *O. mykiss* y *T. chungaraensis*. En el caso de los aislados provenientes del intestino de *O. mykiss* y *T. chungaraensis*, se determinó la CMI de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, observándose aislados con CMI superiores a 160 µg/ml. Pese a existir ciertas diferencias entre los tres grupos de trabajo, se observa susceptibilidad reducida a varios antibióticos betalactámicos. Además, en el

caso de la combinación amoxicilina/ácido clavulánico, se observó que más del 50% de los aislados estudiados de cada especie de pez presentó CMI's superiores al máximo detectable por la técnica empleada. Al comparar la cantidad de aislados ensayados para antibióticos betalactámicos por sí solos, como ampicilina, y en combinación con un inhibidor, se observa una reducción en la cantidad de aislados, lo cual podría ser consistente con la producción de betalactamasas. Por otro lado, considerando las cepas ensayadas para AMC, y teniendo en cuenta que el ácido clavulánico es un inhibidor de una gran variedad de betalactamasas, esto podría estar indicando la presencia de mecanismos de resistencia no enzimáticos, o bien la producción de betalactamasas que no son inhibidas por este compuesto, como es el caso de la familia de betalactamasas AmpC. Además de penicilinas y cefalosporinas, se determinó CMI para el carbapenémico ertapenem, observando valores superiores a 32 µg/ml en los tres casos, siendo nuevamente la máxima concentración permitida por la prueba ensayada. Aunque la cantidad de aislados es baja en comparación con el total de cepas, los resultados son relevantes, considerando que en el contexto clínico muchas veces este tipo de antibióticos es utilizado como último recurso en el tratamiento de patógenos multirresistentes. Si bien este resultado podría ser

indicativo de la presencia de carbapenemasas, en los estudios de susceptibilidad llevados a cabo en trabajos previos (Mardones, 2024), no se observaron halos de inhibición menores o iguales a 14 mm para imipenem. Considerando la estructura de estos dos carbapenémicos, ertapenem es una molécula de mayor tamaño, y en mecanismos de resistencia asociados a disminución en la permeabilidad de la membrana, en conjunto con producción de betalactamasas, se han descrito cepas que pierden la susceptibilidad a ertapenem pero no a otros carbapenémicos (Su et al., 2025).

En el caso de la trucha arcoíris, se han llevado a cabo diversos estudios en los cuales se ha demostrado la presencia de bacterias con susceptibilidad reducida frente a antibióticos betalactámicos (Akinbowale et al., 2007; Capkin et al., 2017). Sin embargo, estos estudios han sido realizados en granjas de cultivo, donde el uso de antibióticos puede ejercer presión de selección sobre las comunidades bacterianas. El año 2019 se estudiaron bacterias provenientes de peces de agua dulce, donde se determinaron los perfiles de susceptibilidad a diversos antibióticos, destacando la resistencia a ampicilina en el 100% de las cepas (Fauzi et al., 2021). Hace algunos años se publicó un estudio donde

se trabajó con algunas cepas aisladas de salmónidos en el Alto Ártico canadiense, donde se observó resistencia a diferentes antibióticos, destacando nuevamente ampicilina (Moniz et al., 2022). En un trabajo publicado por Ozaktas et al. (2012), se aislaron bacterias de la superficie de algunos ejemplares de peces de agua dulce y se ensayaron pruebas de susceptibilidad a algunos antibióticos. Los resultados demostraron altos niveles de resistencia en más del 80% de los aislados, con CMI's que superaban los 900 µg/ml en el caso de ampicilina, estreptomycin, kanamicina y cloranfenicol (Ozaktas et al., 2012). Estos y otros estudios demuestran la presencia de bacterias resistentes a antibióticos, no solo betalactámicos, en diferentes especies de peces que habitan ecosistemas en los que no se emplea el uso de estos compuestos y no están relacionados con actividades como acuicultura, e incluso en algunos casos ecosistemas que se encuentran alejados de cualquier impacto antropogénico.

3. Identificación molecular de las cepas

Para identificar las cepas seleccionadas en este estudio, se amplificó y secuenció el gen codificante del ARNr 16S, lo que permitió agruparlas en 8 géneros bacterianos. En los tres grupos de estudio, la mayor cantidad de cepas fueron identificadas dentro del género *Pseudomonas*. Asimismo, se identificaron varias cepas correspondientes al género *Aeromonas* y *Serratia*. Si bien se observan mayores similitudes en la identificación de los aislados provenientes del intestino de *O. mykiss* y *T. chungaraensis*, la cantidad de cepas estudiadas no permitiría establecer que la composición de la microbiota intestinal de ambos peces sea similar. Esto considerando que se trabajó con no más de 3 aislados bacterianos por cada ejemplar, destacando además que esto es solo una porción del total de bacterias cultivables según el método de procesamiento utilizado. Se observó una menor diversidad en el caso de los aislados de *O. chungarensis*; sin embargo, esto podría deberse a que fue menor el número de cepas sometidas a identificación molecular. En el caso de las dos especies de peces endémicos, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis*, estos son los primeros estudios relacionados con la microbiota intestinal, por otro lado, la trucha arcoíris ha sido ampliamente estudiada. Algunos de los géneros bacterianos identificados coinciden con reportes en trabajos

realizados en microbiota intestinal de trucha arcoíris (Huber et al., 2004; Kim et al., 2007; Labitt et al., 2021). Si bien la secuenciación del gen ARNr 16S ha sido empleada durante muchos años para la identificación molecular de bacterias, presenta algunas desventajas y, con el avance de las tecnologías, hoy existen técnicas de identificación más eficaces. A pesar de ser un gen universal, no siempre es lo suficientemente variable para identificar y diferenciar especies cercanas. Considerando esto, la identificación se realizó a nivel de género bacteriano, y debido a bajos porcentajes de cobertura e identidad, 5 aislados no pudieron ser identificados.

4. Relación genética de las cepas

Las muestras obtenidas de los hisopados intestinales de las tres especies de peces fueron procesadas bajo tres condiciones de aislamiento diferentes de

manera simultánea (Mardones, 2024). Debido a esto y con el fin de evitar la selección de potenciales clones, se llevó a cabo la técnica ERIC-PCR.

Aunque originalmente fue empleada para *E. coli*, ha sido ampliamente utilizada para diferenciar diversas especies, no solo pertenecientes al orden *Enterobacterales*, e incluso su uso se ha extendido a bacterias Gram positivas (Mamishi et al., 2019). Las cepas de trabajo fueron agrupadas según los géneros bacterianos identificados previamente. Como se mencionó en secciones anteriores, no todas las cepas fueron sometidas a este análisis, debido a la baja cantidad de cepas del género *Yersinia* y *Paenibacillus*. En el caso del género *Carnobacterium*, si bien se contaba con 5 cepas, no se obtuvieron suficientes bandas de amplificación para llevar a cabo los análisis posteriores. Esto podría estar relacionado con diversas causas, como podrían ser una mala calidad del ADN extraído, la cantidad de secuencias ERIC presentes en el genoma o bien el programa de amplificación empleado. Es importante mencionar que no se estableció ningún umbral de similitud para establecer grupos de cepas altamente relacionadas genéticamente, esto considerando que los análisis se hicieron a nivel de género y probablemente

se contaba con diferentes especies, dentro del grupo de cepas estudiadas. Debido a esto, las diferencias en los patrones de bandas de dos aislados podrían indicar, por un lado, que se trata de dos cepas distintas pertenecientes a una misma especie, o bien, que son dos aislados pertenecientes a diferentes especies dentro del mismo género.

Partiendo por el género *Aeromonas*, se analizaron 12 cepas provenientes de las tres especies de peces estudiados (Figura 7). Se puede observar que las cepas se agrupan dependiendo de la especie de pez de la cual provenían, y algunas comparten 100% de similitud en el dendrograma. Por el nivel de resolución de la técnica, y considerando que solo se está trabajando a nivel de género, es prácticamente imposible definir a dos cepas como clones, aunque compartan el mismo patrón de bandas. A pesar de esto, en el caso de las cepas 314-315 y 181-184, estas provenían de los mismos ejemplares de peces, lo cual podría indicar una alta probabilidad de que sean la misma cepa, considerando la metodología de procesamiento de las muestras. También se observan altos niveles de similitud genética entre cepas de diferentes muestras, como el caso de las cepas 74 y 230, provenientes de *O.*

chungarensis, las que se encuentran cercanas a una cepa aislada del intestino de *O. mykiss*. En el dendrograma del género *Serratia* (Figura 8), se observan nuevamente agrupaciones según la especie de pez, y varios grupos de cepas con similitud de 100%. Esto se observa para cepas recuperadas desde las mismas muestras, como el caso de las cepas 95-98 y 251-252. Estas últimas también compartieron el mismo patrón de amplificación con las cepas 300 y 308, las cuales provenían de muestras distintas, pero de la misma especie de pez. Esto podría indicar que se trata de la misma especie de *Serratia* o bien cepas altamente relacionadas dentro de una misma especie. Además, se observa que las cepas aisladas del intestino de *T. chungarensis* se encuentran más cercanas a las del intestino de *O. mykiss*, con porcentajes de similitud superiores al 90%, mientras que las cepas de *O. chungarensis* se separan en ramas más distantes. Se analizaron 7 cepas pertenecientes al género *Rahnella* (Figura 9), la mayoría de ellas (6/7) aisladas del intestino de *T. chungaraensis*. Las cepas 303-310, que comparten un 100% de similitud, fueron aisladas de la misma muestra, lo que podría indicar que se trata de la misma cepa, al igual que las cepas 59-65. Se analizó solo una cepa de *O. mykiss*, la cual se encontró más cercana a una cepa de *T. chungaraensis*, y ambas se separaron del resto de aislados en el dendrograma. En el caso del género *Shewanella* (Figura 10),

se contó con 2 aislados de *O. chungarensis* y 2 de *O. mykiss*, cada uno de ellos proveniente de muestras intestinales diferentes. Se puede observar que las cepas provenientes de *O. mykiss* comparten un 100% de similitud entre ellas y se acercan bastante genéticamente a la cepa 124, mientras que la cepa 229 se encuentra más distante. Por último, para el análisis del género *Pseudomonas* (Figura 11) se contó con un total de 24 cepas. Se puede observar bastante variabilidad entre las cepas, lo cual podría deberse a la presencia de distintas especies, donde encontramos cepas aisladas de las tres especies de peces pero que a la vez provenían de muestras diferentes. Si bien se generan varias ramas dentro del dendrograma, se pueden observar parejas de cepas que comparten un 100% de similitud, como 121-122, 125-126 y 295-298. Cada una de estas parejas corresponde a un grupo diferente; sin embargo, fueron aisladas desde las mismas muestras, lo que potencialmente indicaría que se trata de la misma cepa. Para este análisis, a diferencia de los demás géneros, no se observan separaciones dependiendo de la especie de pez de la cual provenían los aislados estudiados. Considerando todos los análisis de ERIC-PCR realizados, se pudo observar que, si bien en la mayoría de los casos las cepas tuvieron una tendencia a agruparse según la especie de pez, también existieron cepas altamente relacionadas, al comparar los tres grupos

de estudio (*O. mykiss*, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis*). Esto no es de extrañar considerando se trata de la microbiota intestinal peces que habitan un mismo ecosistema; sin embargo, ciertos factores que los diferencian, como sus ciclos de vida y el tipo de alimentación, podrían explicar las agrupaciones que se observaron. Además, es importante mencionar que si bien habitan dentro del mismo ecosistema, *T. chungaraensis* se encuentra en una pequeña vertiente próxima al lago; sin embargo, no interacciona con las otras dos especies. Por otro lado, tanto *O. mykiss* como *O. chungarensis* habitan el lago Chungará, pero esta última especie se asocia más a zonas de poca profundidad dentro del mismo lago. Las relaciones observadas podrían sugerir que algunas cepas provienen de un mismo ancestro común, pero debido a lo anteriormente mencionado y otros factores ambientales ocurrieron procesos de adaptación y variabilidad genética, lo que se refleja en cambios en los patrones de amplificación. Diversos estudios en los que se compara la microbiota intestinal de diferentes peces han demostrado que factores como especie de pez, dieta, ciclos de vida y hábitats afectan su composición (Li et al., 2014; Li et al., 2018; Ye et al., 2023). Asimismo, también se ha demostrado que especies que comparten el mismo hábitat presentan ciertas similitudes en la microbiota (Nikouli et al., 2021; Zhang et al., 2019).

5. Detección molecular de betalactamasas

La detección de genes de betalactamasas se llevó a cabo a través de PCR convencional. Sin embargo, ninguna de las cepas seleccionadas presentó genes codificantes para betalactamasas de las familias TEM, SHV, AmpC y OXA. Si bien estas enzimas han sido descritas en cepas de diversos ambientes, no hay ningún antecedente sobre estudios de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del Lago Chungará. Teniendo en cuenta que se detectó producción de betalactamasas mediante prueba de nitrocefina, esto estaría indicando que las cepas son portadoras de enzimas pertenecientes a otras familias. Según el método del disco combinado, se detectó producción de betalactamasas tipo AmpC en 13 cepas; sin embargo, no hubo amplificación de los genes codificantes. Si bien los partidores empleados permiten la amplificación de distintas variantes de betalactamasas tipo AmpC, tanto cromosómicas como plasmidiales, es posible que no hayan sido

capaces de alinear y amplificar los genes codificantes para las enzimas de esas cepas.

6. Análisis bioinformáticos

Para poder estudiar con mayor profundidad algunas de las cepas y poder identificar los genes de resistencia que estas portaban, se secuenció el genoma completo de 20 cepas. La selección de las cepas se basó en los resultados obtenidos previamente. En cuanto a los reportes del control de calidad de los ensamblajes, se pudo observar que los resultados fueron variados, lo cual se explica en que se secuenciaron 20 cepas pertenecientes a diferentes géneros y especies bacterianas. Con respecto al largo total de los genomas, se observó que los genomas más pequeños correspondieron a las bacterias Gram positivas, identificadas anteriormente mediante secuenciación del gen del ARNr 16S. Mientras que el genoma más grande correspondió a una bacteria Gram negativa, con 8.41 Mpb. Los resultados respectivos de número de *contigs*, N50 y N90 indicarían que en conjunto se

obtuvo una buena secuenciación y buen ensamble con las herramientas empleadas.

En relación a la identificación de las cepas secuenciadas, se emplearon tres herramientas bioinformáticas diferentes. En primer lugar, se llevó a cabo la identificación con el uso de la plataforma JSpeciesWS (Tabla 12) mediante búsqueda por tetracorrelación, en la cual se van comparando los genomas en grupos de 4 nucleótidos y se genera un coeficiente de correlación. En la mayoría de los casos se informó la identificación a nivel de género, ya que la plataforma indicó resultados considerados como muy buenos para varias especies pertenecientes al mismo género. Esto podría explicarse por las similitudes genéticas que existen muchas veces entre diferentes especies dentro de un mismo género, y que hace más difícil su identificación. Los resultados obtenidos se corresponden con los mencionados anteriormente para la identificación molecular, sumándose a esto la identificación de las tres cepas restantes, que correspondían a las cepas 254, 187 y 331, identificadas como *Serratia* sp., *Lelliotia amnigena* y *Erwinia* sp., respectivamente. Para complementar estos análisis se empleó la plataforma PubMLST (Tabla 13), que cuenta con una herramienta de identificación

basada en genes codificantes para proteínas que conforman el ribosoma bacteriano (rMLST). Pese a no utilizar el genoma completo, se logró identificar la especie con soportes superiores al 90% en la mayoría de las cepas. Sumado a esto, y considerando las especies indicadas por la herramienta rMLST, se descargaron los genomas de las cepas tipo de cada una de ellas y se empleó la herramienta fastANI. Se observaron valores cercanos o superiores al 95% en la mayoría de las cepas secuenciadas. En el caso de las cepas 254, 90, 187, 121 y 125 se obtuvieron valores menores pero cercanos al 95%, lo que podría indicar que pertenecen a la misma especie o bien podría tratarse de otra especie genéticamente relacionada, para lo cual tendrían que realizarse más análisis con los genomas. Por otro lado, los valores ANI no superaron el 87% para ninguna de las especies del género *Pseudomonas* comparadas con la cepa 248, aislada del intestino de *T. chungaraensis*, la cual presentaba el genoma más largo de las cepas secuenciadas. Si bien el tamaño de los genomas de *Pseudomonas* es bastante variable, considerando un rango entre 5 Mpb y 7 Mpb, el tamaño del genoma de la cepa 248 se aleja de estos valores por más de un millón de pares de bases. Esto podría indicar que se trata de una contaminación con más de una cepa bacteriana, o bien de una nueva especie de *Pseudomonas*, teniendo en

cuenta que es un aislado del intestino de un pez endémico que no ha sido estudiado previamente. Se observaron altos niveles de completitud en los genomas bacterianos; sin embargo, los niveles de contaminación fueron variados. Si bien la gran mayoría de los genomas presentaron niveles bajos de contaminación, los restantes presentaron porcentajes considerados como medios e incluso uno con niveles de contaminación altos. Con respecto a esto, es importante mencionar que la herramienta CheckM establece un set de genes marcadores a partir de genomas de referencia en la base de datos. Sin embargo, tiene limitaciones al trabajar con taxa poco representados, ya que no se establece un conjunto de genes marcadores bien definido y esto afecta la calidad de las estimaciones de completitud y contaminación. En el caso de las cepas estudiadas, se mencionó que el análisis no se pudo realizar a nivel de especie, debido a que la herramienta no contaba con genomas de referencia, y se tuvo que establecer a nivel de género o incluso a nivel de familia. Aquello podría haber incidido y sobreestimado los niveles de contaminación de los genomas. Al igual que con los resultados de los reportes de calidad de ensamblajes, en la anotación de genes se evidenciaron resultados variables, lo que se explica por la secuenciación de cepas pertenecientes a diferentes géneros y especies bacterianas.

Continuando con la identificación de genes de resistencia, se realizó en primera instancia con la herramienta ABRicate, a partir de la cual se logró identificar distintas regiones codificantes como potenciales genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos. En el caso de las betalactamasas, se observaron genes codificantes para enzimas de clase A, B, C y D. Sin embargo, con la herramienta ABRicate no se identificó betalactamasas en todas las cepas secuenciadas, lo cual es extraño considerando los resultados fenotípicos de la prueba de nitrocefina. Se usó la base de datos de betalactamasas BLDB, considerando, por un lado, que permite realizar alineamientos de secuencias proteicas y además que es una base de datos curada. Si bien depende de la cantidad de secuencias depositadas en la plataforma, se lograron identificar betalactamasas en todas las cepas. Además, los porcentajes de identidad aumentaron considerablemente, superando el 90% en la mayoría de los casos. Sin embargo, en algunos de los casos la identidad no superó el 80%, lo cual podría tener relación con la cantidad de secuencias depositadas en esta base de datos. Por otro lado, considerando que el Lago Chungará es un ecosistema sin antecedentes de estudios de resistencia a antibióticos, y más aún, que no

se ha estudiado la microbiota intestinal de las especies de peces endémicas que allí habitan, existe la posibilidad de identificar nuevas enzimas; sin embargo, esto requeriría mayores análisis. Sumado a esto, las familias de betalactamasas identificadas por ambas herramientas difirieron en algunos casos, lo cual puede deberse a las diferencias en las bases de datos empleadas por cada una. Al analizar los datos de la BLDB, se observó que en todos los casos las betalactamasas identificadas habían sido descritas en bacterias pertenecientes al mismo género, a excepción de la enzima identificada en la cepa 189. En las cepas del género *Serratia*, se lograron identificar betalactamasas de clase A, B y C. Las cepas 100 y 251, identificadas como *Serratia fonticola*, presentaron las mismas enzimas, de las familias FONA y SFDC (clases A y C, respectivamente). Distintas variantes de betalactamasas de la familia FONA han sido descritas en *S. fonticola* (Fuentes-Castillo et al., 2021; Tanimoto et al., 2021). En el caso de SFDC, esta fue descrita el año 2021 como una nueva betalactamasa cromosomal tipo AmpC en *S. fonticola* (Dong et al., 2021). Estas enzimas confieren resistencia a distintos antibióticos betalactámicos, especialmente cefalosporinas en el caso de la familia SFDC, lo cual podría explicar los altos valores de CMI para algunos de los antibióticos empleados. Las otras dos cepas de este género, 254 y 153,

presentaron una betalactamasa en común perteneciente a la familia SPC (clase C). Además, la cepa 153 portaba el gen codificante para una betalactamasa de la familia SPR (clase B). Esta última tiene capacidad de hidrolizar carbapenémicos, pero no se observó susceptibilidad reducida a este tipo de antibióticos, lo que podría indicar que no está siendo expresada. La primera descripción de betalactamasas SPR fue en 2013, mencionada como una betalactamasa de clase B inusual en *S. proteamaculans* (Vella et al., 2013). Diferentes especies dentro del género *Serratia* han sido descritas como portadoras de betalactamasas cromosómicas, lo que lleva al desarrollo de resistencia intrínseca a antibióticos betalactámicos (Stock et al., 2003). En el género *Aeromonas*, las tres cepas (71, 314 y 173) presentaron el mismo patrón de betalactamasas. Se identificaron tres betalactamasas en cada una, pertenecientes a las familias ASA3, OXA y CphA (clases C, D y B, respectivamente). En el caso de la familia OXA, la variante con mayor porcentaje de identidad correspondió a *bla*_{OXA-956}, la cual fue descrita por primera vez en una cepa de *A. salmonicida* aislada de microbiota intestinal de salmón (Vasquez-Ponce et al., 2022). Por otro lado, la familia de betalactamasas CphA ha sido ampliamente descrita en especies de *Aeromonas* (Chen et al., 2012; Piotrowska et al., 2017; Segatore et al., 1993).

Si bien la familia CphA se asocia con resistencia a carbapenémicos, las cepas no presentaron susceptibilidad reducida a este tipo de antibióticos lo cual nuevamente podría ser explicado por la falta de expresión del gen. Las tres cepas del género *Rahnella* (189, 65 y 310) codificaron para una sola betalactamasa de clase A; sin embargo, las familias difirieron, lo cual podría deberse a las diferencias en las especies identificadas. En el caso de las cepas identificadas como *Rahnella aceris*, se identificó una betalactamasa de la familia RAHN que, como sus siglas lo indican, fueron identificadas dentro del mismo género bacteriano (Bellais et al., 2001). Mientras que en el caso de la cepa identificada como *Rahnella rivi* se observó otra enzima de la familia SMO, la cual fue descrita en una bacteria cercana taxonómicamente a especies de los géneros *Rahnella* y *Ewingella* (Lartigue et al., 2013). En el caso de las cepas del género *Pseudomonas* (248, 90, 121, 125 y 242) se identificó una betalactamasa en cada una de clase C. Sin embargo, los porcentajes de identidad en algunas de ellas no superaron el 90%, lo cual podría indicar que corresponden a variantes nuevas dentro de la misma familia de enzimas o bien secuencias de variantes existentes que aún no han sido depositadas en la base de datos. Los géneros menos representados, correspondientes a *Yersinia* (cepa 88), *Erwinia* (cepa 331) y *Lelliottia* (cepa

187), presentaron betalactamasas de clase C y una de clase A en el caso de la cepa 88, identificada como *Yersinia intermedia*, cuyos porcentajes de identidad no superaron el 90% en ninguna de las enzimas, lo cual podría deberse a que las secuencias depositadas en la base de datos correspondían a las de una especie diferente de *Yersinia*. Por último, en las cepas Gram positivas (82 y 272), para las cuales no se identificaron betalactamasas con ABRicate, fueron portadoras de una betalactamasa de clase A identificada con la BLDB. Sin embargo, los porcentajes de identidad, esta vez, no superaron el 80%, y las secuencias correspondían a enzimas descritas en otras especies dentro del género *Carnobacterium* (Meziane-Cherif et al., 2008).

A partir del análisis posterior para identificar elementos genéticos móviles se estableció que todos estos genes se localizaban en el cromosoma. Además, al comparar la identificación de genes de resistencia con base en los géneros bacterianos, se pudo observar que, sobre todo en el caso de los genes codificantes de betalactamasas, existía una relación con el género bacteriano en el cual fueron identificadas las enzimas. Esto se corroboró con los análisis estadísticos realizados, en los cuales se establecieron diferencias significativas entre géneros bacterianos, lo cual podría indicar que se trata de

mecanismos de resistencia intrínsecos. A diferencia de esto, al comparar los resultados obtenidos según la especie de pez de la cual fueron aisladas las cepas secuenciadas, no se observan diferencias significativas. Esto indicaría que la presencia de estos genes no depende de la especie de pez, sino que directamente del género bacteriano que se está analizando. Esto podría sugerir que hay una baja presión de selección ambiental en el Lago Chungará, considerando que es un ecosistema poco impactado, donde no existen antecedentes de la presencia de antibióticos por fuentes externas, como actividades humanas. El año 2022 se publicó un estudio realizado en la antártica, analizando zonas de alto y bajo impacto antropogénico. Al comparar los resistomas, se establecieron diferencias en la abundancia y diversidad de genes de resistencia presentes en los dos tipos de zonas estudiadas (Centurion et al., 2022). Estudios realizados en muestras de suelo de la meseta tibetana también demostraron diferencias en la diversidad y abundancia de genes de resistencia (Wang et al., 2022). Esto podría sugerir que al haber impacto humano, la presión de selección genera una diferenciación de los resistomas.

CONCLUSIÓN

- La microbiota intestinal de *O. mykiss*, *O. chungarensis* y *T. chungaraensis* presenta una susceptibilidad reducida a antibióticos betalactámicos, y la producción de betalactamasas, identificada como el principal mecanismo de resistencia enzimático en la mayoría de las cepas analizadas, constituye una posible explicación de esta baja susceptibilidad.
- Los estudios moleculares revelan que la microbiota intestinal de las tres especies de peces del Lago Chungará está compuesta principalmente por bacterias del filo *Pseudomonadota*, clase *Gammaproteobacteria*, destacando el género *Pseudomonas* como el predominante.
- A partir de los análisis bioinformáticos se detectaron genes codificantes de betalactamasas en todas las cepas secuenciadas, correspondientes a enzimas de las clases A, B, C y/o D. Además, se identificaron otros potenciales genes de resistencia a diferentes familias de antibióticos, todos estos localizados a nivel cromosómico.

- La diversidad de las betalactamasas identificadas depende del género bacteriano y no de la especie de pez, lo que sugiere una baja presión de selección ambiental en este ecosistema extremo.
- En conjunto, estos resultados conducen al rechazo de la hipótesis inicial planteada.

BIBLIOGRAFÍA

- Akinbowale, O. L., Peng, H., Grant, P., & Barton, M. D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int J Antimicrob Agents*, 30(2), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.03.012>
- Andersson, D. I., Jerlström-Hultqvist, J., & Näsvall, J. (2015). Evolution of new functions de novo and from preexisting genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017996>
- Antimicrobial Resistance Collaborators, C. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
- Archundia, D., Duwig, C., Lehembre, F., Chiron, S., Morel, M. C., Prado, B., Bourdat-Deschamps, M., Vince, E., Aviles, G. F., & Martins, J. M. F. (2017). Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes. *Sci Total Environ*, 576, 671-682. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.129>
- Archundia, D., Martins, J. M. F., Lehembre, F., Morel, M. C., & Duwig, C. (2021). Sulfamethoxazole biodegradation and impacts on soil microbial communities in a Bolivian arid high altitude catchment. *Chemosphere*, 284, 131335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131335>
- Bansal, S., & Tandon, V. (2011). Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 37(3), 253-255. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.11.022>
- Bellais, S., Poirel, L., Fortineau, N., Decousser, J. W., & Nordmann, P. (2001). Biochemical-Genetic Characterization of the Chromosomally Encoded Extended-Spectrum Class A beta-lactamase from *Rahnella aquatilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2965-2968. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.45.10.2965-2968.2001>
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B.Aires*, 29(2).

- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, *13*(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B., & Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, *4*(1). <https://doi.org/doi:10.3390/microorganisms4010014>
- Botts, R. T., Apffel, B. A., Walters, C. J., Davidson, K. E., Echols, R. S., Geiger, M. R., Guzman, V. L., Haase, V. S., Montana, M. A., La Chat, C. A., Mielke, J. A., Mullen, K. L., Virtue, C. C., Brown, C. J., Top, E. M., & Cummings, D. E. (2017). Characterization of Four Multidrug Resistance Plasmids Captured from the Sediments of an Urban Coastal Wetland. *Front Microbiol*, *8*, 1922. <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2017.01922>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(3), 969-976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, *3*, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Capkin, E., Ozdemir, S., Ozturk, R. C., & Altinok, I. (2017). Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. *Aquaculture Research*, *48*(11), 5561-5575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.13378>
- Carattoli, A., & Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In F. de la Cruz (Ed.), *Horizontal Gene Transfer: Methods and Protocols* (pp. 285-294). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9877-7_20
- Centurion, V. B., Silva, J. B., Duarte, A., Rosa, L. H., & Oliveira, V. M. (2022). Comparing resistome profiles from anthropogenically impacted and non-impacted areas of two South Shetland Islands - Maritime Antarctica. *Environ Pollut*, *304*, 119219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119219>
- Chen, P. L., Ko, W. C., & Wu, C. J. (2012). Complexity of beta-lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. *J Microbiol Immunol Infect*, *45*(6), 398-403. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2012.08.008>
- Cheng, M., Dai, J. J., Zhang, J. F., Su, Y. T., Guo, S. Q., Sun, R. Y., Wang, D., Sun, J., Liao, X. P., Chen, S., & Fang, L. X. (2024). Evolution and maintenance of a large

- multidrug-resistant plasmid in a *Salmonella enterica* Typhimurium host under differing antibiotic selection pressures. *mSystems*, 9(11), e0119724. <https://doi.org/10.1128/msystems.01197-24>
- Cué Brugueras, M., Morejón García, Moisés. (1998). Antibacterianos de acción sistémica. Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Rev Cubana Med Gen Integr* 14(4), 347-361.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457-461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., & de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Res Microbiol*, 143(8), 785-790. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(92\)90107-y](https://doi.org/10.1016/0923-2508(92)90107-y)
- Di Cello, F., Pepi, M., Baldi, F., & Fani, R. (1997). Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. *Res Microbiol*, 148(3), 237-249. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)85244-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)85244-8)
- Di Giovanni, G. D., Watrud, L. S., Seidler, R. J., & Widmer, F. (1999). Comparison of Parental and Transgenic Alfalfa Rhizosphere Bacterial Communities Using Biolog GN Metabolic Fingerprinting and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Microb Ecol*, 37(2), 129-139. <https://doi.org/10.1007/s002489900137>
- Dong, X., Zhang, P., Zhou, K., Liang, J., Li, Q., Zhang, X., Zhou, D., Lu, W., Sun, Z., Liu, H., Lu, J., Lin, X., Li, K., Xu, T., Zhang, H., Zhu, M., & Bao, Q. (2021). Characterization and identification of SFDC-1, a novel AmpC-type beta-lactamase in *Serratia fonticola*. *Environ Microbiol*, 23(12), 7512-7522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.15663>
- Dorador, C., Pardo, R., & Vila, I. (2003). Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Revista chilena de historia natural*, 76, 15-22. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2003000100002&nrm=iso
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of b-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(5-6), 385-392. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>

- Embley, T. M., & Stackebrandt, E. (1994). THE MOLECULAR PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF THE ACTINOMYCETES. *Annual Review of Microbiology*, 48(Volume 48), 257-289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.001353>
- EUCAST. (2013). EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance *Version 1.0*.
- Fauzi, N., Hamdan, R. H., Mohamed, M., Ismail, A., Mat Zin, A. A., & Mohamad, N. F. A. (2021). Prevalence, antibiotic susceptibility, and presence of drug resistance genes in *Aeromonas* spp. isolated from freshwater fish in Kelantan and Terengganu states, Malaysia. *Vet World*, 14(8), 2064-2072. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2064-2072>
- Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 661-681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Fuentes-Castillo, D., Power, P., Cerdeira, L., Cardenas-Arias, A., Moura, Q., Oliveira, F. A., Levy, C. E., Gutkind, G., Catão-Dias, J. L., & Lincopan, N. (2021). FONA-7, a Novel Extended-Spectrum β -Lactamase Variant of the FONA Family Identified in *Serratia fonticola*. *Microb Drug Resist*, 27(5), 585-589. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0061>
- Gauba, A., & Rahman, K. M. (2023). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 12(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>
- Gautier-Bouchardon, A. V. (2018). Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr*, 6(4). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0030-2018>
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849-853. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Gomez, J. E., Kaufmann-Malaga, B. B., Wivagg, C. N., Kim, P. B., Silvis, M. R., Renedo, N., Ioerger, T. R., Ahmad, R., Livny, J., Fishbein, S., Sacchettini, J. C., Carr, S. A., & Hung, D. T. (2017). Ribosomal mutations promote the evolution of antibiotic resistance in a multidrug environment. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.20420>
- González, K., Rivara, P., Docmac, F., Gomez-Uchida, D., & Harrod, C. (2024). Habitat-based variation in the trophic ecology of the world's highest-altitude self-

- sustaining population of invasive rainbow trout. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*(425). <https://doi.org/https://doi.org/10.1051/kmae/2024015>
- Guedron, S., Tolu, J., Brisset, E., Sabatier, P., Perrot, V., Bouchet, S., Develle, A. L., Bindler, R., Cossa, D., Fritz, S. C., & Baker, P. A. (2019). Late Holocene volcanic and anthropogenic mercury deposition in the western Central Andes (Lake Chungará, Chile). *Science of The Total Environment*, 662, 903-914. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.294>
- Guerrero-Olmos, K., Báez, J., Valenzuela, N., Gahona, J., Del Campo, R., & Silva, J. (2014). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Enterococcus* species from gut microbiota of Chilean Altiplano camelids. *Infect Ecol Epidemiol*, 4. <https://doi.org/10.3402/iee.v4.24714>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hanson, C. W., & Martin, W. J. (1978). Modified agar dilution method for rapid antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 13(3), 383-388. <https://doi.org/10.1128/aac.13.3.383>
- Heras, J., Dominguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ--a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16, 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Hernando-Amado, S. C., T. M. Baquero, F. Martinez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nat Microbiol*, 4(9), 1432-1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T., & Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol*, 96(1), 117-132. <https://doi.org/doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02109.x>
- Huovinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis*, 32(11), 1608-1614. <https://doi.org/https://doi.org/10.1086/320532>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jain, C., Rodriguez, R. L., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species

- boundaries. *Nat Commun*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jara, D., Bello-Toledo, H., Dominguez, M., Cigarroa, C., Fernandez, P., Vergara, L., Quezada-Aguiluz, M., Opazo-Capurro, A., Lima, C. A., & Gonzalez-Rocha, G. (2020). Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Sci Rep*, 10(1), 3145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60035-0>
- Jarma, D., Sanchez, M. I., Green, A. J., Peralta-Sanchez, J. M., Hortas, F., Sanchez-Melsio, A., & Borrego, C. M. (2021). Faecal microbiota and antibiotic resistance genes in migratory waterbirds with contrasting habitat use. *Sci Total Environ*, 783, 146872. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146872>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33(3), 300-305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Kim, D. H., Brunt, J., & Austin, B. (2007). Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol*, 102(6), 1654-1664. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x>
- Kong, K. F., Schneper, L., & Mathee, K. (2011). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118(1), 1-36. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x>
- Labitt, R. N., Ren, J., & Marquis, H. (2021). Emergence of phenotypic and genotypic resistance in the intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed long-term to sub-inhibitory concentrations of sulfamethoxazole. *Ecotoxicology*, 30(10), 2043-2054. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02480-9>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Lartigue, M. F., Nordmann, P., Edelstein, M. V., Cuzon, G., Brisse, S., & Poirel, L. (2013). Characterization of an extended-spectrum class A beta-lactamase from a novel enterobacterial species taxonomically related to *Rahnella* spp./*Ewingella* spp. *J Antimicrob Chemother*, 68(8), 1733-1736. <https://doi.org/doi:10.1093/jac/dkt122>

- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5), 371-387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Li, J., Ni, J., Li, J., Wang, C., Li, X., Wu, S., Zhang, T., Yu, Y., & Yan, Q. (2014). Comparative study on gastrointestinal microbiota of eight fish species with different feeding habits. *J Appl Microbiol*, 117(6), 1750-1760. <https://doi.org/doi:10.1111/jam.12663>
- Li, X., Yu, Y., Li, C., & Yan, Q. (2018). Comparative study on the gut microbiotas of four economically important Asian carp species. *Science China Life Sciences*, 61(6), 696-705. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-9296-5>
- Lupo, V., Mercuri, P. S., Frère, J.-M., Joris, B., Galleni, M., Baurain, D., & Kerff, F. (2022). An Extended Reservoir of Class-D Beta-Lactamases in Non-Clinical Bacterial Strains. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e00315-00322. <https://doi.org/doi:10.1128/spectrum.00315-22>
- Mamishi, S., Mohammadian, M., Pourakbari, B., Hosseinpour Sadeghi, R., Haghi Ashtiani, M. T., Abdosalehi, M. R., Rahmani, M., & Mahmoudi, S. (2019). Antibiotic Resistance And Genotyping Of Gram-Positive Bacteria Causing Hospital-Acquired Infection In Patients Referring To Children's Medical Center. *Infect Drug Resist*, 12, 3719-3726. <https://doi.org/10.2147/idr.S220522>
- Mann, A., Nehra, K., Rana, J. S., & Dahiya, T. (2021). Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. *Curr Res Microb Sci*, 2, 100030. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>
- Mardones, V. (2024). *Susceptibilidad a antibióticos y tolerancia a mercurio en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile*. Trabajo de grado, Bioingeniería, Universidad de Concepción, Chile.
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*, 11, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Meziane-Cherif, D., Decré, D., Høiby, E. A., Courvalin, P., & Périchon, B. (2008). Genetic and Biochemical Characterization of CAD-1, a Chromosomally Encoded New Class A Penicillinase from *Carnobacterium divergens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 551-556. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.01145-07>

- Miranda García, M. C. (2013). *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanidad Militar*, 69, 244-248. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712013000400003&nrm=iso
- Moniz, K., Walker, V. K., & Shah, V. (2022). Antibiotic resistance in mucosal bacteria from high Arctic migratory salmonids. *Environ Microbiol Rep*, 14(3), 385-390. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12975>
- Montgomery, K., Raymundo, L., Jr., & Drew, W. L. (1979). Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *J Clin Microbiol*, 9(2), 205-207. <https://doi.org/10.1128/jcm.9.2.205-207.1979>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Muteeb, G., Rehman, M. T., Shahwan, M., & Aatif, M. (2023). Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals (Basel)*, 16(11). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph16111615>
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917-919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Neron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in *Klebsiella*. *Microorganisms*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040700>
- Nikouli, E., Meziti, A., Smeti, E., Antonopoulou, E., Mente, E., & Kormas, K. A. (2021). Gut Microbiota of Five Sympatrically Farmed Marine Fish Species in the Aegean Sea. *Microbial Ecology*, 81(2), 460-470. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01580-z>
- O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., & Shingler, A. H. (1972). Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother*, 1(4), 283-288. <https://doi.org/10.1128/AAC.1.4.283>
- Osterman, I. A., Dontsova, O. A., & Sergiev, P. V. (2020). rRNA Methylation and Antibiotic Resistance. *Biochemistry (Mosc)*, 85(11), 1335-1349. <https://doi.org/10.1134/S000629792011005X>

- Ozaktas, T., Taskin, B., & Gozen, A. G. (2012). High level multiple antibiotic resistance among fish surface associated bacterial populations in non-aquaculture freshwater environment. *Water Res*, 46(19), 6382-6390. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.010>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*, 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Piotrowska, M., Przygodzinska, D., Matyjewicz, K., & Popowska, M. (2017). Occurrence and Variety of beta-Lactamase Genes among *Aeromonas* spp. Isolated from Urban Wastewater Treatment Plant. *Front Microbiol*, 8, 863. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863>
- Poorter, M. D., Lowe, S. M., Boudjelas, S., & Browne, M. (2000). 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo : una selección del Global Invasive Species Database.
- Potron, A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2011). Origin of OXA-181, an emerging carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, as a chromosomal gene in *Shewanella xiamenensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), 4405-4407. <https://doi.org/10.1128/aac.00681-11>
- Rabbia, V., Bello-Toledo, H., Jiménez, S., Quezada, M., Domínguez, M., Vergara, L., Gómez-Fuentes, C., Calisto-Ulloa, N., González-Acuña, D., López, J., & González-Rocha, G. (2016). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Antarctic bird feces, water from inside a wastewater treatment plant, and seawater samples collected in the Antarctic Treaty area. *Polar Science*, 10(2), 123-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polar.2016.04.002>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Richter, M., Rossello-Mora, R., Oliver Glockner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929-931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Roberts, M. C., & Schwarz, S. (2016). Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. *J Environ Qual*, 45(2), 576-592. <https://doi.org/doi:10.2134/jeq2015.04.0207>

- Rodríguez-Martínez, J. M. (2005). Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones [10.1157/13070406]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(1), 25-31. <https://doi.org/10.1157/13070406>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microb Genom*, 7(11). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
- Segatore, B., Massidda, O., Satta, G., Setacci, D., & Amicosante, G. (1993). High specificity of cphA-encoded metallo-beta-lactamase from *Aeromonas hydrophila* AE036 for carbapenems and its contribution to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(6), 1324-1328. <https://doi.org/10.1128/aac.37.6.1324>
- Selim, S. (2022). Mechanisms of gram-positive vancomycin resistance (Review). *Biomed Rep*, 16(1), 7. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1490>
- Seral Garcia, C., Pardos de la Gandara, M., & Castillo Garcia, F. J. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28 Suppl 1, 12-18. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70003-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70003-3)
- Sethuvel, D. P. M., Bakthavatchalam, Y. D., Karthik, M., Irulappan, M., Shrivastava, R., Periasamy, H., & Veeraraghavan, B. (2023). beta-Lactam Resistance in ESKAPE Pathogens Mediated Through Modifications in Penicillin-Binding Proteins: An Overview. *Infect Dis Ther*, 12(3), 829-841. <https://doi.org/10.1007/s40121-023-00771-8>
- Sharma, A., Gupta, V. K., & Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*, 149(2), 129-145. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2079_17
- Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog*, 85(Pt 1), 57-72. <https://doi.org/10.3184/003685002783238870>
- Stock, I., Burak, S., Sherwood, K. J., Grüger, T., & Wiedemann, B. (2003). Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(4), 865-885. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg156>
- Su, Y., Zou, G., Huang, X., Bi, J., Meng, L., Zhao, W., & Li, T. (2025). Molecular characterization and resistance mechanisms of ertapenem-non-susceptible

- carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring ESBLs or AmpC enzymes with porin loss or efflux pump overexpression. *Journal of Bacteriology*, 207(7), e00148-00125. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.00148-25>
- Suarez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001> (Antibióticos betalactámicos.)
- SUBPESCA, S. d. P. y. A. (2015). *Acuerdan medidas para erradicar trucha arcoiris del lago Chungará.*
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., & Knapp, C. W. (2019). Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*, 10, 1933. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01933>
- Tanimoto, K., Nomura, T., Hashimoto, Y., Hirakawa, H., Watanabe, H., & Tomita, H. (2021). Isolation of *Serratia fonticola* Producing FONA, a Minor Extended-Spectrum beta-Lactamase (ESBL), from Imported Chicken Meat in Japan. *Jpn J Infect Dis*, 74(1), 79-81. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2020.114>
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I., & Vasileva-Tonkova, E. (2015). Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Frontiers in Life Science*, 8(4), 348-357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1044130>
- Turner, J., Muraoka, A., Bedenbaugh, M., Childress, B., Pernot, L., Wiencek, M., & Peterson, Y. K. (2022). The Chemical Relationship Among Beta-Lactam Antibiotics and Potential Impacts on Reactivity and Decomposition. *Front Microbiol*, 13, 807955. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.807955>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdacs, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health*, 14(12), 1750-1766. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Urquiza Ayala, G., Arce Chuquimia, J., & Alanoca Mamani, G. (2018). Resistencia bacteriana por beta lactamasas de espectro extendido: un problema creciente. *Revista Médica La Paz*, 24, 77-83. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582018000200012&nrm=iso

- Vasquez-Ponce, F., Higuera-Llanten, S., Paras-Silva, J., Gamboa-Acuna, N., Cortes, J., Opazo-Capurro, A., Ugalde, J. A., Alcalde-Rico, M., & Olivares-Pacheco, J. (2022). Genetic characterization of clinically relevant class 1 integrons carried by multidrug resistant bacteria (MDRB) isolated from the gut microbiota of highly antibiotic treated *Salmo salar*. *J Glob Antimicrob Resist*, 29, 55-62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.02.003>
- Vella, P., Miraula, M., Phelan, E., Leung, E. W., Ely, F., Ollis, D. L., McGeary, R. P., Schenk, G., & Mitic, N. (2013). Identification and characterization of an unusual metallo-beta-lactamase from *Serratia proteamaculans*. *J Biol Inorg Chem*, 18(7), 855-863. <https://doi.org/10.1007/s00775-013-1035-z>
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 19(24), 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Walsh, F. (2013). Investigating antibiotic resistance in non-clinical environments. *Front Microbiol*, 4, 19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00019>
- Wang, H., Su, X., Su, J., Zhu, Y., & Ding, K. (2022). Profiling the antibiotic resistome in soils between pristine and human-affected sites on the Tibetan Plateau. *J Environ Sci (China)*, 111, 442-451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.019>
- Wang, J., Ma, W., Fang, Y., Liang, H., Yang, H., Wang, Y., Dong, X., Zhan, Y., & Wang, X. (2021). Core Oligosaccharide Portion of Lipopolysaccharide Plays Important Roles in Multiple Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 65(10), e0034121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AAC.00341-21>
- Wilson, D. N., Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020). Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 18(11), 637-648. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z>
- Ye, C., Geng, S., Zhang, Y., Qiu, H., Zhou, J., Zeng, Q., Zhao, Y., Wu, D., Yu, G., Gong, H., Hu, B., & Hong, Y. (2023). The impact of culture systems on the gut microbiota and gut metabolome of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Animal Microbiome*, 5(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s42523-023-00239-7>
- Yuan, K., Yu, K., Yang, R., Zhang, Q., Yang, Y., Chen, E., Lin, L., Luan, T., Chen, W., & Chen, B. (2019). Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in Antarctic soils. *Ecotoxicol Environ Saf*, 176, 300-308. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.099>

- Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2007). Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 361-385. <https://doi.org/DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x>
- Zhang, Z., Li, D., Xu, W., Tang, R., & Li, L. (2019). Microbiome of Co-cultured Fish Exhibits Host Selection and Niche Differentiation at the Organ Scale. *Front Microbiol*, 10, 2576. <https://doi.org/doi:10.3389/fmicb.2019.02576>
- Zinsstag, J., Meisser, A., Schelling, E., Bonfoh, B., & Tanner, M. (2012). From 'two medicines' to 'One Health' and beyond. *Onderstepoort J Vet Res*, 79(2), 492. <https://doi.org/doi:10.4102/ojvr.v79i2.492>

ANEXOS

Tabla S1.- Programas de amplificación utilizados para la búsqueda de genes en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile.

Gen Blanco	Etapas de amplificación					
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Ciclos	Extensión final
ARNr 16S	98 °C x 30 s	98 °C x 10 s	58 °C x 30 s	72 °C x 45 s	30	72 °C x 5 min
ERIC	95 °C x 7 min	94 °C x 40 s	52 °C x 1 min	72 °C x 5 min	35	72 °C x 10 min
<i>bla</i> _{TEM}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	64 °C x 30 s	72 °C x 1 min	30	72 °C x 5 min
<i>bla</i> _{SHV}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	60 °C x 30 s	72 °C x 30 s	30	72 °C x 5 min
<i>bla</i> _{AmpC}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	62 °C x 30 s	72 °C x 1 min	30	72 °C x 5 min
<i>bla</i> _{OXA-1}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	51 °C x 30 s	72 °C x 1 min	30	72 °C x 5 min
<i>bla</i> _{OXA-2}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	58 °C x 30 s	72 °C x 1 min	30	72 °C x 5 min
<i>bla</i> _{OXA-10}	95 °C x 3 min	95 °C x 30 s	52 °C x 30 s	72 °C x 1 min	30	72 °C x 5 min

Tabla S2.- Genes de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, identificados con ABRicate.

Nº Cepa	Especie de pez	Identificación bacteriana	Gen	Cobertura (%)	Identidad (%)
71	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Aeromonas piscicola</i>	<i>mcr-7.1</i>	96,85	73,28
			<i>bla</i> _{FOX-4}	92,95	88,3
			<i>bla</i> _{OXA-427}	100	88,3
			<i>mcr-7.1</i>	92,96	74,18
			<i>cphA5</i>	99,87	93,47
254	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia</i> sp.	<i>oqxA10</i>	89,97	71,82
			<i>oqxB24</i>	98,29	79,9

			<i>tet(34)</i>	73,76	72,96
			<i>bla-C</i>	99,65	83,85
			<i>qnrE1</i>	98,14	78,52
100	<i>O. mykiss</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>bla_{ACT-38}</i>	99,65	74,83
			<i>bla_{FONA-6}</i>	99,21	96,25
			<i>tet(34)</i>	74,84	70,9
			<i>qnrE1</i>	82,02	72,13
251	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>bla_{FONA-6}</i>	99,21	96,14
			<i>tet(34)</i>	74,84	70,34
			<i>bla_{ACT-38}</i>	99,65	74,74
			<i>qnrE1</i>	81,86	71,81
189	<i>O. mykiss</i>	<i>Rahnella rivi</i>	<i>oqx_{B17}</i>	99,46	81,21
			<i>oqx_{A10}</i>	91,33	72,97
			<i>vat(F)</i>	75,08	71,74
			<i>bla_{CTX-M-75}</i>	89,16	76,76
			<i>tet(34)</i>	74,84	70,34
314	<i>O. chungarensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>bla_{FOX-4}</i>	93,21	88,27
			<i>mcr-7.1</i>	94,94	72,5
			<i>cphA1</i>	99,74	95,15
			<i>bla_{OXA-427}</i>	100	85,79
88	<i>O. mykiss</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>vat(F)</i>	89,94	77,46
			<i>bla_{A_Yent}</i>	99,55	74,8
			<i>tet(34)</i>	78,49	71,27
173	<i>O. mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>bla_{FOX-3}</i>	95,56	86,79
			<i>mcr-7.1</i>	94,88	72,52
			<i>cphA5</i>	98,17	96,55
			<i>bla_{OXA-427}</i>	100	85,66
65	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i>	<i>oqx_{B9}</i>	99,05	79,53
			<i>oqx_{A10}</i>	91,33	71,31
			<i>bla_{RAHN-2}</i>	100	97,64
			<i>tet(34)</i>	74,84	70,9
310	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i>	<i>tet(34)</i>	74,84	70,9
			<i>bla_{RAHN-2}</i>	100	98,2
			<i>oqx_{A10}</i>	91,33	71,4
			<i>oqx_{B9}</i>	99,05	79,56
82	<i>O. mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	-	-	-
272	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	-	-	-

248	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>bla_{PDC-23}</i>	85,76	73,92
			<i>oqx_{B20}</i>	98,92	88,2
			<i>oqx_{A9}</i>	99,74	86
187	<i>O. mykiss</i>	<i>Leliottia</i> sp.	<i>vat(F)</i>	89,19	72,38
			<i>bla_{ACT-49}</i>	99,74	76,68
			<i>tet(34)</i>	89,68	72,71
90	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>bla_{PDC-234}</i>	87,02	70,61
121	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>bla_{PDC-4}</i>	74,37	70,3
125	<i>O. chungarensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>bla_{PDC-4}</i>	74,71	71,16
331	<i>O. chungarensis</i>	<i>Erwini rhapontici</i>	<i>tet(34)</i>	74,41	73,01
			<i>qnr_{B59}</i>	70,08	74,78
242	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas edaphica</i>	<i>bla_{PDC-356}</i>	74,62	70,17
			<i>fosA-354827590</i>	82,35	70,8
			<i>qnr_{E1}</i>	97,98	79,46
			<i>tet(34)</i>	73,76	72,68
153	<i>O. chungarensis</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	<i>oqx_{A10}</i>	89,63	72,45
			<i>oqx_{B25}</i>	98,19	80,24
			<i>bla-C</i>	99,38	83,89
			<i>bla_{SPR-1}</i>	99,89	85,86

Tabla S3.- Betalactamasas identificadas en bacterias aisladas del intestino de peces del Lago Chungará, Chile, con la base de datos BLDB.

Nº Cepa	Especie de pez	Identificación bacteriana	Betalactamasa	Identidad	Identidad (%)
71	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Aeromonas piscicola</i>	ASA3-9	382/382	100
			OXA-956	255/264	96,59
			CphA-1	242/253	95,65
254	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia quinivorans</i>	SPC-1	363/378	96,03
100	<i>O. mykiss</i>	<i>Serratia fonticola</i>	SFDC-1	369/382	96,6
			FONA-8	293/295	99,32
251	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Serratia fonticola</i>	FONA-8	293/295	99,32
			SFDC-1	370/382	96,86

189	<i>O. mykiss</i>	<i>Rahnella rivi</i>	SMO-1	268/295	90,85
314	<i>O. chungarensis</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	ASA3-29	374/382	97,91
			CphA-1	240/253	94,86
			OXA-956	264/264	100
88	<i>O. mykiss</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	BlaA-2	238/294	80,95
			YEC-1	342/388	88,14
173	<i>O. mykiss</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i>	ASA3-7	378/383	98,69
			CphA-5	243/253	96,05
			OXA-956	263/264	99,62
65	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i>	RAHN-3	293/295	99,32
310	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Rahnella aceris</i>	RAHN-3	295/295	100
82	<i>O. mykiss</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	CAD-1	196/291	67,35
272	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	CAD-1	196/291	67,35
248	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	PFL-6	238/386	61,66
187	<i>O. mykiss</i>	<i>Leliottia</i> sp.	LAQ-1	355/380	93,42
90	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	PFL-5	355/384	92,45
121	<i>O. mykiss</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	PFL-4	294/380	77,37
125	<i>O. chungarensis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	PFL-3	289/380	76,05
331	<i>O. chungarensis</i>	<i>Erwini rhapontici</i>	ERH-1	371/371	100
242	<i>T. chungaraensis</i>	<i>Pseudomonas edaphica</i>	PFL-4	274/377	72,94
153	<i>O. chungarensis</i>	<i>Serratia proteamaculans</i>	SPC-3	375/378	99,21
			SPR-1	276/298	92,62