



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular

Tolerancia a ciprofloxacino y capacidad de biotransformación en bacterias aisladas de bahías subantárticas

Tesis para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

Vicente Antonio Arriagada Moreno
Concepción-Chile
2026

Profesor Guía: Gerardo González Rocha
Depto. de Microbiología, Facultad Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

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

Profesor Co-Guía

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora

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

Dr. José Becerra Allende
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Dr. Ramón Ahumada Rudolph
Departamento de Química
Universidad del Bío-Bío

Agradecimientos

Quisiera expresar, en primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Prof. Gerardo por haberme recibido en su laboratorio y por brindarme su constante apoyo, orientación y mentoría durante el desarrollo de esta tesis. Asimismo, agradezco a todos los integrantes del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), que me acompañaron, ayudaron e hicieron más amenos los días difíciles en el laboratorio.

Agradezco también a la Dra. Claudia Mansilla y a la Dra. Jimena Torres por la oportunidad de participar en la expedición científica al Estrecho de Magallanes realizada en septiembre de 2021, financiada por los proyectos PAI-ANID 77180002 y 77170027. En particular, agradezco a la Dra. Mansilla por su invaluable apoyo durante el trabajo en terreno.

Finalmente, deseo agradecer a mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de este proceso, especialmente a mi madre, mi padre y mi hermano, quienes estuvieron presentes en cada etapa de este camino. Dedico también un especial recuerdo a mis abuelos, quienes partieron durante el desarrollo de esta tesis, pero cuyo cariño, apoyo y enseñanzas continúan acompañándome y dándome fuerzas. Asimismo, agradezco profundamente a mis amigos de toda la vida y a aquellos que encontré en Concepción, por su paciencia, compañía y apoyo constante durante los momentos más desafiantes de estos años.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Presencia de Antibióticos en el medioambiente	5
1.2	Procesos de degradación y transformacion microbiana de antibioticos	10
1.3	Potencial biotecnológico de microorganismos provenientes de la Antártica y área subantártica	14
2	Hipótesis	19
3	Objetivo general.....	19
3.1	Objetivos específicos	19
4	Metodología.....	20
4.1	Sitios de estudio	20
4.2	Recolección de muestras y aislamiento de bacterias.....	21
4.3	Análisis fisicoquímico del sedimento	23
4.4	Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos	24
4.5	Extracción de ADN genómico	25
4.6	Identificación molecular de los aislados bacterianos	26
4.7	Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR.....	27
4.8	Preparación de la solución stock de ciprofloxacino	29
4.9	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria para ciprofloxacino	29
4.10	Evaluación del crecimiento en presencia de ciprofloxacino bajo fuente de carbono disponible	30
4.11	Incubación de cepas seleccionadas para la evaluación posterior de actividad antimicrobiana residual de ciprofloxacino.....	31
4.12	Análisis de datos y generación de curvas de crecimiento	33
4.13	Bioensayo para la evaluación de la actividad antimicrobiana residual de ciprofloxacino.....	33
4.14	Secuenciación y ensamblaje de genomas completos	35
4.15	Identificación taxonómica basada en genoma completo	36
4.16	Análisis genómico de genes asociados a resistencia antimicrobiana, eflujo y permeabilidad	37
5	Resultados.....	39
5.1	Caracterización ambiental de los sitios de estudio.....	39
5.1	Aislamiento de cepas bacterianas.....	42
5.2	Identificación molecular de los aislados bacterianos.	43



5.3	Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos	45
5.4	Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR convencional	49
5.5	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino	50
5.6	Crecimiento bacteriano en presencia de ciprofloxacino bajo distintas fuentes de carbono	51
5.7	Dinámica de crecimiento de cepas seleccionadas en presencia de ciprofloxacino .	52
5.8	Evaluación funcional de la actividad antimicrobiana residual en sobrenadantes de cultivos incubados con ciprofloxacino	56
5.9	Caracterización genómica de cepas seleccionadas por su respuesta frente a ciprofloxacino.....	58
5.10	Análisis de genes de resistencia, dianas de fluoroquinolonas y sistemas de eflujo .	60
6	Discusión.....	63
6.1	Contexto ambiental y recuperación de bacterias cultivables	63
6.2	Susceptibilidad antimicrobiana en aislados ambientales	65
6.3	Tolerancia a ciprofloxacino y disponibilidad de carbono	66
6.4	Actividad antimicrobiana residual y evaluación funcional de biotransformación	70
6.5	Caracterización genómica y mecanismos asociados a la respuesta frente a ciprofloxacino.....	71
7	Conclusiones.....	73
8	Bibliografía	75
9	Anexo	92

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en subantártica.	21
Figura 2. Registro visual de residuos sólidos e intervención local en los sitios de muestreo del Estrecho de Magallanes.	40
Figura 3. Variación de humedad y materia orgánica en las muestras de sedimento. ...	42
Figura 4. Composición relativa de géneros bacterianos aislados desde muestras de agua de mar y sedimento de bahía Dos Lobos (DL) y Puesto Pomar (PP).	45
Figura 5. Susceptibilidad antibiótica y distribución de perfiles de no susceptibilidad en aislados bacterianos obtenidos.	46
Figura 6. Dinámica de crecimiento de cepas seleccionadas y consorcio bacteriano bajo distintas condiciones de carbono y CIP.	54
Figura 7. Crecimiento de cepas seleccionadas y consorcio bacteriano bajo distintas condiciones de carbono y ciprofloxacino.	55
Figura 8. Actividad antimicrobiana residual relativa de los sobrenadantes obtenidos durante los ensayos de incubación con ciprofloxacino.	57

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos registrados in situ en muestras de sedimento y agua de mar.	41
Tabla 2. Integración del contenido de humedad y recuentos bacterianos en sedimentos.	43
Tabla 3. Perfiles de resistencia antibiótica y géneros bacterianos asociados en aislados de Dos Lobos y Puesto Pomar.	48
Tabla 4. Distribución del índice MAR e IRA en aislados bacterianos de bahía Dos Lobos y Puesto Pomar.	49
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino en agar MH.....	51
Tabla 6. Crecimiento bacteriano en distintas fuentes de carbono en presencia de ciprofloxacino.....	52
Tabla 7. Métricas de ensamblaje, calidad y anotación de los genomas de cepas seleccionadas.....	59
Tabla 8. Comparación genómica mediante ANIb entre DL38 y DLAM9.....	60
Tabla 9. Genes asociados resistencia antimicrobiana o funciones relacionadas detectados en cepas seleccionadas.....	61
Tabla 10. Genes candidatos asociados a dianas de CIP, eflujo multidroga y permeabilidad de membrana externa anotados mediante Prokka.	62

Resumen

El ciprofloxacino (CIP) es un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria, reconocido por su recalcitrancia, baja biodegradabilidad relativa y persistencia de actividad antimicrobiana en distintas matrices. Debido a estas características, constituye un contaminante emergente de interés para estudiar respuestas microbianas asociadas a tolerancia, transformación parcial y potenciales aplicaciones biotecnológicas. El objetivo de esta tesis fue evaluar bacterias cultivables aisladas desde agua de mar y sedimento de dos bahías subantárticas para determinar su capacidad de tolerar CIP y promover su biotransformación parcial mediante procesos co-metabólicos dependientes de la disponibilidad de carbono. Para ello, se obtuvieron aislados bacterianos desde las bahías subantárticas, Dos Lobos (DL) y Puesto Pomar (PP), sitios seleccionados por presentar señales locales de intervención antrópica. Las cepas fueron caracterizadas mediante ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria de CIP, crecimiento en medio mínimo M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio, bioensayos de actividad antimicrobiana residual y análisis genómicos de aislados seleccionados. Los resultados evidenciaron perfiles heterogéneos de no susceptibilidad antimicrobiana, principalmente frente a ampicilina, cefuroxima y cloranfenicol. La tolerancia a CIP se restringió a un subconjunto de aislados y dependió del contexto metabólico del cultivo. En medio mínimo, el crecimiento en presencia de CIP ocurrió principalmente cuando se incorporó acetato de sodio como fuente adicional de carbono, mientras que CIP por sí solo no sostuvo crecimiento detectable. La actividad antimicrobiana residual se mantuvo durante el ensayo, sin una disminución temporal

consistente atribuible a la incubación bacteriana, por lo que no se obtuvo evidencia funcional suficiente para demostrar la biotransformación parcial del antibiótico. A nivel genómico, no se identificaron genes clásicos de resistencia a quinolonas ni sustituciones en la región determinante de resistencia a quinolonas (QRDR) asociadas a fluoroquinolonas. En conjunto, la hipótesis fue respaldada parcialmente, ya que los aislados toleraron CIP bajo condiciones dependientes de carbono, aunque no promovieron una biotransformación funcionalmente detectable. Desde una perspectiva biotecnológica, estos resultados destacan el valor de los aislados ambientales subantárticos como modelos para estudiar respuestas fisiológicas frente a antibióticos en ambientes fríos y orientar estrategias de bioprospección centradas en tolerancia, co-sustratos y biotransformación de contaminantes emergentes.

Abstract

Ciprofloxacin (CIP) is a fluoroquinolone widely used in human and veterinary medicine, recognized for its recalcitrance, relatively low biodegradability, and persistence of antimicrobial activity in different matrices. These characteristics make CIP an emerging contaminant of interest for studying microbial responses associated with tolerance partial transformation, and potential biotechnological applications. The aim of this thesis was to evaluate culturable bacteria isolated from seawater and sediment from two subantarctic bays to determine their capacity to tolerate CIP and promote its partial transformation through co-metabolic processes dependent on carbon availability. For this purpose, bacterial isolates were obtained from Dos Lobos (DL) and Puesto Pomar (PP) bays, sites selected based on local signs of anthropogenic intervention. The strains were characterized by antimicrobial susceptibility assays, minimum inhibitory concentration of CIP, growth in M9 minimal medium supplemented with glucose or sodium acetate, residual antimicrobial activity bioassays, and genomic analyses of selected isolates. The results showed heterogeneous antimicrobial non-susceptibility profiles, mainly against ampicillin, cefuroxime, and chloramphenicol. CIP tolerance was restricted to a subset of isolates and depended on the metabolic context of the culture. In minimal medium, growth in the presence of CIP occurred mainly when sodium acetate was incorporated as an additional carbon source, whereas CIP alone did not sustain detectable growth. Residual antimicrobial activity was maintained throughout the assay, without a consistent temporal decrease attributable to bacterial incubation; therefore, there was insufficient functional evidence to demonstrate partial biotransformation of the antibiotic. At the genomic level, no classical quinolone resistance genes or substitutions in the quinolone resistance-

determining region (QRDR) associated with fluoroquinolones resistance were identified. Overall, the hypothesis was partially supported, as the isolate s tolerated CIP under carbon-dependent conditions, although they did not promote functionally detectable biotransformation. From a biotechnological perspective, these results highlight the value of subantarctic environmental isolates as models for studying physiological responses to antibiotics in cold environments for guiding bioprospecting strategies focused on tolerance, co-substates, and biotransformation of emerging contaminants.

1 **Introducción**

Los antibióticos son compuestos antimicrobianos utilizados como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias en humanos y animales (Cytryn et al., 2017). Además de su uso clínico y veterinario, estos compuestos poseen actividad biológica capaz de modular comunidades microbianas en distintos ambientes. De manera natural, diversos hongos y bacterias sintetizan antibióticos como metabolitos secundarios asociados a funciones competitivas en el entorno microbiano, los cuales pueden inhibir el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático) o producir la muerte de la bacteria (efecto bactericida). Estos efectos son el resultado de la interferencia con procesos celulares esenciales, tales como la biosíntesis de la pared celular, la síntesis proteica o la replicación y reparación del ADN, entre otros mecanismos (Blair et al., 2015; Clardy et al., 2009; Hutchings et al., 2019).

El desarrollo de agentes antimicrobianos modernos se remonta a comienzos del siglo XX, cuando compuestos como el Salvarsán comenzaron a utilizarse para tratar infecciones bacterianas (Aminov, 2010; Crofts et al., 2017). Desde entonces, los antibióticos se han convertido en uno de los pilares fundamentales de la medicina moderna. Su implementación ha tenido un impacto decisivo en la salud humana y animal, consolidándose como un avance fundamental en la medicina moderna al permitir el tratamiento eficaz de infecciones bacterianas y la prevención de complicaciones en intervenciones médicas complejas (Hutchings et al., 2019). En particular, su administración profiláctica en procedimientos quirúrgicos ha contribuido

significativamente a la reducción de la mortalidad asociada a intervenciones invasivas (Ng and Chong, 2012). Sin embargo, el incremento sostenido en su uso ha generado efectos colaterales no previstos, particularmente en relación con la selección y diseminación de la resistencia antimicrobiana (RAM) (Ashfield et al., 2026).

Un análisis global realizado en 76 países de ingresos medios y bajos reveló que, entre 2000 y 2015, el consumo de antibióticos aumentó un 65% (Klein et al., 2018). No obstante, se estima que aproximadamente el 30% de las prescripciones antibióticas son innecesarias (Fleming-Dutra et al., 2016). Asimismo, una revisión sistemática, que incluyó 3.302 estudios, evidenció que el 62% de los antibióticos se dispensan sin prescripción médica, particularmente para el tratamiento de infecciones urinarias y respiratorias, predominando aquellos de amplio espectro (Auta et al., 2019). En el ámbito veterinario, los antibióticos han sido utilizados con fines terapéuticos y subterapéuticos, incluyendo su administración en dosis bajas como promotores de crecimiento en ganado destinado al consumo humano. Aunque esta práctica ha sido restringida o prohibida en diversas regiones, contribuyó históricamente al aumento de la presión selectiva en sistemas agropecuarios (Kemper, 2008; Kumar et al., 2018). En Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), mediante la Resolución Exenta N° 4.854/2019, ha fortalecido la regulación del uso de antimicrobianos en producción animal, restringiéndolo principalmente a fines terapéuticos y metafilácticos, en el marco de un enfoque de uso prudente. Si bien los antibióticos han transformado la medicina moderna, su uso inapropiado e indiscriminado ha favorecido la selección y propagación de la RAM, generando implicancias que trascienden el ámbito clínico (Browne et al., 2021; Bungau

et al., 2021). En este contexto, comprender el papel del ambiente como reservorio y escenario evolutivo de la RAM se vuelve fundamental para abordar esta problemática de manera integral.

La RAM constituye un problema complejo y multifactorial, cuya propagación está determinada por la interacción entre los seres humanos, los animales y el ambiente. Bajo el enfoque *One Health* (Una Salud), estos componentes se encuentran estrechamente interconectados, siendo la cadena alimentaria una de las principales vías para la circulación y diseminación de bacterias resistentes (BRA) y genes de resistencia (GRA). Esta interconexión, sumada a la liberación continua de antibióticos al entorno, ha llevado a considerarlos como contaminantes emergentes en el medioambiente (Carvalho and Santos, 2016; Chaturvedi et al., 2021; García et al., 2020; Gothwal and Shashidhar, 2015; Kemper, 2008; Ventola, 2015). Un factor clave en la diseminación de la RAM radica en que, durante su uso, entre el 50% y el 80% de la dosis ingerida se excreta sin metabolizar completamente a través de la orina y las heces de animales y humanos. En consecuencia, estos compuestos alcanzan los sistemas de alcantarillados y las Plantas de Tratamiento de Aguas Servidas (PTAS). Sin embargo, los procesos convencionales de tratamiento no logran eliminar completamente los antibióticos, las BRA ni los GRA, permitiendo su liberación en los efluentes tratados (Couto et al., 2019). Esta situación favorece la dispersión de la RAM y, aunque las BRA existen de manera natural en el medio ambiente, su prevalencia es significativamente superior en áreas con mayor influencia antropogénica (Kim and Aga, 2007).

Las bacterias poseen diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, cuya expresión puede inducirse o seleccionarse en respuesta a la exposición a estos compuestos. Los genes asociados a estos mecanismos pueden transmitirse mediante transferencia horizontal o vertical, frecuentemente a través elementos genéticos móviles (EGM) (Holmes et al., 2016a; Pehrsson et al., 2016; Sørensen et al., 2005). Así, los GRA pueden diseminarse en el ambiente mediante: (i) transformación, a través de la captación de ADN libre liberado, por ejemplo, tras lisis bacteriana, (ii) conjugación, mediante la transferencia directa de plásmidos u otros elementos conjugativos entre bacterias; y (iii) transducción, mediada por bacteriófagos que pueden movilizar material genético bacteriano (Holmes et al., 2016b). Entre los mecanismos que posibilitan la resistencia se incluyen la inactivación enzimática o modificación química del antibiótico, el impedimento de su ingreso al citoplasma bacteriano, la acción de bombas de expulsión, la producción de moléculas que interfieren en su mecanismo de acción, la alteración o protección del sitio sobre el que actúa (blanco o diana) y la sobreproducción de los blancos intracelulares (Blair et al., 2015; Munita and Arias, 2016).

Debido a la emergencia de este problema, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incorporó la RAM en la estrategia multisectorial Una Salud y estableció un plan de acción global con cinco objetivos estratégicos, entre los que destacan el fortalecimiento de la vigilancia, la investigación y la garantía de inversiones sostenibles para enfrentarla (Mackenzie and Jeggo, 2019; White and Hughes, 2019). En este contexto, la expansión de BRA y la diversidad de mecanismos de resistencia han incrementado la complejidad del control de la RAM a escala global. La capacidad de las bacterias para adquirir y

transferir GRA, sumada a la persistencia de los antibióticos en el ambiente, ha favorecido la aparición y diseminación de nuevas BRA. Este fenómeno ha impulsado la aparición de bacterias con perfiles de resistencia cada vez más amplios, incluyendo cepas multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR), limitando las opciones terapéuticas disponibles y contribuyendo al desarrollo de una crisis sanitaria de alcance mundial (Frost et al., 2005; Kim and Cha, 2021; Kitano et al., 2026). En este escenario, resulta fundamental comprender y monitorear la dispersión de la RAM en matrices ambientales que actúan como reservorios de BRA y GRA, además de constituir espacios de intercambio genético horizontal, a fin de dilucidar la dinámica ecológica de la RAM y diseñar estrategias integrales de vigilancia, prevención y mitigación bajo el enfoque Una Salud (Aarestrup and Woolhouse, 2020; Wu et al., 2025).

1.1 Presencia de antibióticos en el medioambiente

En las últimas décadas, numerosos estudios han documentado la presencia de antibióticos en diversas matrices ambientales, como aguas residuales, aguas superficiales, sedimentos y suelos, lo que evidencia su persistencia en los ecosistemas y su potencial impacto ecológico (Boxall, 2004; Manzetti and Ghisi, 2014; Wu et al., 2025). En consecuencia, estos compuestos han sido reconocidos como contaminantes emergentes debido a su liberación continua, persistencia y actividad biológica residual en el ambiente (Koch et al., 2021a; Martinez, 2009; Ashfield, et al., 2025). Incluso cuando se encuentran a concentraciones inferiores a la concentración mínima inhibitoria (CMI), su presencia puede generar condiciones selectivas que favorecen la persistencia de microorganismos con menor susceptibilidad a los antibióticos (Jutkina et al., 2016; Stanton et al., 2020; Tang et al., 2015; Wang et al., 2025).

Los antibióticos liberados al medioambiente pueden alterar la estructura, composición y función de las comunidades microbianas. A concentraciones elevadas, estos compuestos pueden reducir la diversidad microbiana y favorecer la dominancia de poblaciones tolerantes o resistentes, modificando la composición taxonómica y el funcionamiento de los ecosistemas (Cycoń et al., 2019; Wu et al., 2025). Además, la exposición prolongada a concentraciones subinhibitorias poder inducir respuestas fisiológicas y celulares, incluyendo estrés oxidativo y alteraciones en sistemas de comunicación bacteriana, como el *quorum sensing*, así como en otras vías metabólicas. Estas respuestas pueden modificar las interacciones entre los microorganismos y afectar el funcionamiento de las comunidad microbianas expuestas (Feng et al., 2021; Zhao et al., 2021).

La persistencia de un antibiótico en el ambiente depende tanto de sus propiedades fisicoquímicas como de las características de la matriz ambiental en la que se encuentra. Factores como la adsorción al material particulado, la temperatura, el pH, la actividad microbiana y el contenido de materia orgánica influyen de manera significativa en su degradación y permanencia (Ashfield et al., 2026). Por ejemplo, se ha observado que el ciprofloxacino (CIP), una fluoroquinolona de segunda generación empleada comúnmente en infecciones del tracto urinario y digestivo puede presentar una vida media de 2310 ± 1155 días en biosólidos bajo condiciones experimentales (Walters et al., 2010). Asimismo, entre el 45% y el 62% de la dosis ingerida se excreta por orina y entre un 15% y el 25% por las heces (Giger et al., 2003). Esto implica una liberación constante de

cantidades elevadas de antibióticos hacia las aguas residuales, posteriormente tratadas en las PTAS. Las fluoroquinolonas, como por ejemplo CIP, se han detectado de forma habitual en aguas residuales hospitalarias, en efluentes de PTAS y en diversos cuerpos de agua (ríos y lagos), con concentraciones que van desde los ng/L hasta los $\mu\text{g/L}$ (Hernández et al., 2019; Kümmerer, 2009). Aunque presentan alta afinidad por la materia orgánica del suelo (Leal et al., 2013), también pueden acumularse en lodos de PTAS. En un estudio realizado por Golet et al., 2002 se evidenció que, si bien los lodos activados de una PTAS en Suiza eran capaces de eliminar el 50% de CIP y norfloxacino (NOR), estos compuestos se acumulaban en los lodos y, tras 21 meses sin uso, aún se registraban concentraciones del orden de $\mu\text{g/kg}$, lo que confirma su persistencia frente a la biodegradación. Estos antecedentes evidencian la elevada persistencia ambiental de CIP y su capacidad para acumularse en matrices asociadas a sistemas de tratamiento de aguas servidas.

Las PTAS constituyen una de las principales vías de liberación de antibióticos y elementos de resistencia hacia el medio ambiente, ya que los procesos convencionales no están diseñados para remover completamente estos compuestos ni los genes asociados (Uluseker et al., 2021; Zhu et al., 2024). Las aguas residuales que ingresan a las PTAS contienen mezclas complejas de antibióticos, BRA y GRA provenientes de fuentes hospitalarias, industriales, agrícolas y domésticas (García et al., 2020; Ilabaca-Carrasco et al., 2025; Li et al., 2013; Rizzo et al., 2013; Yan et al., 2021). La combinación de una alta carga biológica y química con procesos no optimizados para estos contaminantes favorece tanto su persistencia como su liberación en los efluentes

(Uluseker et al., 2021; Zhu et al., 2024). Como resultado, concentraciones detectables de antibióticos y GRA pueden encontrarse en los efluentes descargados hacia los cuerpos de agua receptores.

En numerosos casos, estos efluentes son descargados en ríos utilizados para el riego agrícola, favoreciendo el ingreso de antibióticos a los suelos, donde pueden bioacumularse o infiltrarse hacia aguas subterráneas (Manzetti and Ghisi, 2014). Estudios realizados en distintas regiones del mundo han informado concentraciones ambientalmente relevantes de fluoroquinolonas y otros antibióticos en efluentes de PTAS. Por ejemplo, en tres plantas de Estados Unidos se detectaron concentraciones de entre 40 y 705 ng/L de CIP, ofloxacino (OFX), sulfametoxazol (SXT) y trimetoprima (TMP) (Renew and Huang, 2004). De manera similar, un estudio en 13 PTAS europeas identificó 17 antibióticos en concentraciones de 3 a 598 ng/L en efluentes descargados hacia cuerpos de agua dulce y marinos, incluyendo CIP, azitromicina (AZM), sulfapiridina (SPY), ampicilina (AMP), tetraciclina (TET), SXT y TMP (Rodríguez-Mozaz et al., 2020).

La presencia ambiental de antibióticos se encuentra estrechamente vinculada a la actividad antropogénica. Aunque los impactos han sido ampliamente documentados en regiones densamente pobladas y con una intensa actividad agrícola, industrial o sanitaria, estudios recientes han demostrado que estos compuestos también están presentes en ecosistemas considerados remotos o con escasa intervención humana (UNEP, 2023). En particular, en la Antártica, la creciente actividad asociada al turismo, la investigación científica, las bases militares y la pesca ha favorecido la introducción y

dispersión de antibióticos y BRA (González-Alonso et al., 2017; Hernández et al., 2019; Hernández and González-Acuña, 2016; Rabbia et al., 2016; Jara et al., 2020). La mayoría de las infraestructuras en la Antártica se ubican en zonas costeras concentrando aproximadamente el 81% de los asentamientos humanos (Brooks et al., 2019). Dentro de este contexto, la Isla Rey Jorge, ubicada en las Islas Shetland del Sur en el extremo norte de la Península Antártica, concentra una de las mayores densidades de actividad humana del continente. En su sector occidental se encuentra la Bahía Fildes, considerada como uno de los principales polos logísticos y científicos de la Antártica, albergando múltiples bases con dotación permanente y estacionales de distintos países, además de infraestructura aeroportuaria y un elevado tránsito marítimo asociado al abastecimiento, la investigación y el turismo. Hernández et al. (2019) reportaron la presencia de diversos antibióticos en aguas residuales tratadas, descargadas en esta bahía, detectándose CIP en el 92% de las muestras y NOR en el 54%, con concentraciones promedio cercanas a 0,89 µg/L y 0,75 µg/L, respectivamente. Asimismo, CIP fue detectado en muestras de agua de mar recolectadas en las inmediaciones de los emisarios, lo que sugiere una remoción limitada de estos compuestos en los sistemas de tratamiento convencionales y evidencia su dispersión en el entorno costero.

La detección persistente de fluoroquinolonas en efluentes tratados y ambientes marinos costeros, incluso en ecosistemas remotos como la Antártica, plantea interrogantes respecto a su destino ambiental y los procesos que regulan su permanencia o transformación. Una vez liberados al medio, estos compuestos pueden sufrir procesos abióticos como fotólisis, hidrólisis o sorción en partículas y sedimentos. No obstante, la

biodegradación microbiana es identificada como un proceso fundamental en la eliminación y transformación de compuestos orgánicos en ambientes acuáticos, ya que microorganismos heterótrofos capaces de metabolizar o transformar estos compuestos desempeñan un papel clave en su atenuación natural (Bueno et al., 2023; Ji et al., 2025; Narayanan et al., 2023).

1.2 Procesos de degradación y transformación microbiana de antibióticos

La degradación ambiental de antibióticos involucra procesos abióticos y bióticos cuya relevancia relativa depende tanto de las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto como por las condiciones ambientales, incluyendo el pH, la temperatura, la radiación solar, la disponibilidad de oxígeno, la actividad microbiana y el contenido de materia orgánica. La degradación abiótica comprende reacciones fisicoquímicas como la oxidación, la fotólisis o la hidrólisis, cuya contribución varía según la estructura química del antibiótico y las características ambientales (Koch et al., 2021b). Por ejemplo, la hidrólisis es una ruta relevante para la degradación de los β -lactámicos, mientras que la fotólisis desempeña un papel importante en la degradación de quinolonas y tetraciclinas (Braschi et al., 2013; Thiele-Bruhn and Peters / Landbauforschung, 2007). No obstante, en el caso de las fluoroquinolonas, los productos generados por procesos fotoquímicos o hidrolíticos suelen conservar el núcleo quinolónico (4-quinolona, manteniendo parcialmente su actividad antibacteriana (Reis et al., 2020).

Por otro lado, la degradación biótica depende de la actividad catabólica de comunidades microbianas presentes en el sistema, así como de factores ambientales como su contenido de materia orgánica, pH, temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes

y condiciones redox (Cycoñ et al., 2019). Estos procesos pueden manifestarse como biotransformación parcial, modificaciones estructurales específicas o, en menor medida, mineralización completa del compuesto (Reis et al., 2020). Desde el punto de vista metabólico, la biodegradación de antibióticos puede ocurrir mediante metabolismo directo, cuando el antibiótico es utilizado como fuente de carbono y/o nitrógeno, o mediante co-metabolismo, en el cual su transformación ocurre incidentalmente durante la degradación de otros sustratos (Nsenga Kumwimba and Meng, 2019).

En particular, las fluoroquinolonas tienden a presentar tasas de biodegradación inferiores y una mayor persistencia ambiental que otras clases de antibióticos (Kümmerer, 2009; Li and Zhang, 2010; Baran et al., 2026). Este comportamiento se ha atribuido tanto a la estabilidad estructural del núcleo quinolónico, que limita la acción enzimática directa, como a su elevada capacidad de adsorción a materia orgánica y sedimentos, lo que reduce su biodisponibilidad en fase acuosa y favorece su acumulación en matrices sólidas (Leal et al., 2013; Reis et al., 2020; Tolls, 2001). Estudios de biodegradabilidad han mostrado que CIP es recalcitrante en sistemas acuosos, sin mineralización significativa, y que en suelos la fracción mineralizada es baja (<1%), permaneciendo la mayor parte del compuesto como residuos no extraíbles asociados a la matriz sólida (Girardi et al., 2011). Estos resultados indican que su persistencia ambiental está fuertemente condicionada por procesos de sorción y por la limitada biodisponibilidad efectiva del antibiótico.

Las transformaciones microbianas reportadas para CIP incluyen hidroxilación del núcleo aromático, oxidación y modificaciones del anillo piperazínico, desfluoración y modificaciones del grupo carboxílico en posición C-3 (Cai et al., 2022a; Roh et al., 2009). No obstante, estas reacciones corresponden principalmente a modificaciones funcionales periféricas que alteran su actividad antibacteriana, sin implicar necesariamente la ruptura del núcleo quinolónico. Asimismo, se ha descrito la N-acetilación del anillo de piperazina mediada por la enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr, generando derivados acetilados con menos actividad antimicrobiana; sin embargo, esta modificación constituye un mecanismo de inactivación más que una ruta catabólica completa (Robicsek et al., 2006). En consecuencia, la evidencia disponible sugiere que la transformación microbiana de CIP en sistemas ambientales corresponde mayoritariamente a procesos de modificación parcial de su estructura.

Diversos estudios han señalado que la transformación de CIP ocurre con mayor frecuencia bajo esquemas de co-metabolismo que como resultado de su utilización como fuente exclusiva de carbono (Bueno et al., 2023; Liao et al., 2016). Feng et al. (2019) demostraron que un consorcio bacteriano incrementó significativamente la remoción de CIP en presencia de co-sustratos fácilmente asimilables, tales como aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, mientras que su degradación fue limitada cuando el antibiótico se suministró como único sustrato. De manera consistente, otros trabajos han reportado que la disponibilidad de fuentes adicionales de carbono favorece la aparición

de metabolitos derivados de transformaciones oxidativas parciales del compuesto (Cai et al., 2022a; Liao et al., 2016).

En sistemas de tratamiento biológico, procesos como la nitrificación han sido asociados a la transformación de ciertos antibióticos, donde enzimas como la amoniacomonooxigenasa puede participar en reacciones de oxidación no específicas (Roh et al., 2009; Yu et al., 2018). No obstante, la eficiencia de biodegradación varía considerablemente entre compuestos y depende de su estructura química, concentración inicial y de la composición de la comunidad microbiana. Estos antecedentes sugieren que la disponibilidad de sustratos primarios puede inducir actividad metabólica que favorece la transformación co-metabólica de CIP, sin que ello implique necesariamente su incorporación directa al metabolismo central ni su mineralización completa.

A pesar de los avances en la caracterización de rutas de transformación de CIP y de la identificación de consorcios bacterianos capaces de modificarlo en condiciones experimentales, aún existe información limitada sobre capacidad intrínseca de comunidades bacterianas provenientes de ambientes naturales para transformar fluoroquinolonas bajo condiciones de restricción nutricional y bajas temperaturas. Esta brecha de conocimiento es particularmente evidente en sistemas marino-costeros subantárticos, donde la presión antropogénica asociada al tráfico marítimo y actividad pesquera podría favorecer la introducción ocasional de compuestos farmacológicos

persistentes, aunque no haya estudios que evalúen específicamente la presencia o concentración de CIP en estos ambientes.

En este contexto, la capacidad de comunidades microbianas adaptadas a condiciones ambientales extremas para transformar compuestos recalcitrantes adquiere particular interés. La persistencia estructural de fluoroquinolonas como CIP y la dependencia de procesos de co-metabolismo sugieren que la producción de enzimas implicadas en su transformación podría estar condicionada por las adaptaciones metabólicas propias de cada ecosistema. Por ello, explorar el potencial metabólico de microorganismos provenientes de ambientes fríos y oligotróficos permite ampliar la comprensión de los mecanismos de transformación de antibióticos en condiciones ambientales poco estudiadas, abriendo además la posibilidad de identificar capacidades biotecnológicas asociadas a dichas adaptaciones.

1.3 Potencial biotecnológico de microorganismos provenientes de la Antártica y área subantártica

Los ambientes extremos, como la Antártica y subantártica, constituyen reservorios de diversidad microbiana aun poco caracterizadas, en los que la selección impuesta por condiciones ambientales restrictivas favorece adaptaciones fisiológicas de potencial interés biotecnológico (González-Rocha et al., 2017; Collins and Margesin, 2019). En este continente, la fracción libre de hielo representa una proporción reducida de la superficie total y concentra la mayor parte de la actividad biológica y la infraestructura humana (Brooks et al., 2019; Terauds et al., 2012). Estas áreas se distribuyen en

regiones biogeográficas diferenciadas por gradientes ambientales y un marcado aislamiento geográfico, lo que contribuye a una marcada heterogeneidad espacial de comunidades microbianas (Terauds et al., 2012; Zucconi et al., 2025).

La actividad microbiana en sistemas antárticos está condicionada principalmente por bajas temperaturas, disponibilidad limitada de agua en estado líquido y escasez de carbono orgánico utilizable, además de factores como radiación UV elevada y ciclos hidrológicos variables (Cary et al., 2010; Cavicchioli et al., 2019). Estas restricciones ambientales limitan la productividad y favorecen la persistencia de microorganismos con estrategias eficientes de mantenimiento celular y aprovechamiento de recursos, características que pueden traducirse en capacidades metabólicas de interés biotecnológico y ambiental (Collins and Margetsin, 2019; Kuddus et al., 2024).

Las bacterias psicrófilas han desarrollado un conjunto de adaptaciones estructurales y regulatorias que les permiten mantener el crecimiento y la actividad metabólica a bajas temperaturas (Collins and Margetsin, 2019; Ramón et al., 2023). En ambientes fríos, la disminución de la fluidez de la membrana y la reducción de la actividad enzimática se asocian a una caída en la eficiencia de transcripción y traducción, en parte por la estabilización de estructuras secundarias en ácidos nucleicos y por restricciones en el plegamiento de proteínas (Keto-Timonen et al., 2016; Zhang and Gross, 2021). Para contrarrestar estos efectos, es frecuente la remodelación de la membrana, incluyendo incrementos en la concentración de ácidos grasos insaturados y otros ajustes lipídicos, lo que permite preservar la fluidez de la membrana en condiciones de baja temperatura

(Collins and Margesin, 2019; Li et al., 2024; Ramón et al., 2023). A nivel catalítico, aquellas enzimas adaptadas al frío suelen mostrar mayor eficiencia catalítica relativa a bajas temperaturas, atribuida en muchos casos a mayor flexibilidad conformacional y menor estabilidad térmica, lo que resulta relevante desde una perspectiva biotecnológica (Hamid et al., 2022; Kuddus et al., 2024).

En paralelo a los sistemas antárticos, los hábitats subantárticos del Estrecho de Magallanes albergan una diversidad microbiana potencialmente relevante, al combinar condiciones ambientales frías con gradientes oceanográficos complejos. Esta región incluye múltiples bahías influenciadas por corrientes provenientes del Océano Pacífico, Atlántico y por la corriente circumpolar, además de presentar un tránsito marítimo significativo (Armada de Chile, 2020; Brun et al., 2020; Moore et al., 2018). Aunque sectores del área occidental corresponden a zonas protegidas y de baja ocupación permanente, existen presiones relacionadas a la actividad pesquera y al tránsito marítimo. En este contexto, el Convenio Internacional para Prevenir la Contaminación por Buques (MARPOL) permite, en su Anexo IV, la descarga de aguas servidas no tratadas a 12 millas náuticas (~22 km) de la costa (*Annex IV of MARPOL 73/78 Regulations for the Prevention of Pollution by Sewage from Ships*, n.d.), aun cuando se aplican ciertos tratamientos, no es posible garantizar la completa eliminación de residuos de antibióticos (Kovalakova et al., 2020; Vicente-Cera et al., 2019).

Un estudio reciente de Marcoleta et al. (2022) aisló 113 cepas de zonas cercanas a las bases antárticas (áreas intervenidas) y 166 cepas de áreas no intervenidas, revelando

que únicamente tres cepas de áreas no intervenidas mostraban resistencia a CIP, frente a 24 cepas resistentes en las zonas intervenidas. El análisis metagenómico también señaló que los principales mecanismos de resistencia se relacionan con enzimas que inactivan antibióticos y con bombas de expulsión. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos realizados en la Península Fildes por Jara et al. (2020), quienes detectaron bacterias y genes de resistencia en ambientes dulceacuícolas cercanos a actividades humanas, incluyendo resistencia a CIP y una elevada frecuencia de resistencia a TET y otros antimicrobianos. Del mismo modo, Rabbia et al. (2016) demostraron que los cuerpos de agua influenciados por descargas provenientes de bases científicas presentaban una mayor prevalencia de bacterias resistentes en comparación con sitios menos impactados. En conjunto, estos antecedentes indican que, aunque la resistencia a los antimicrobianos forma parte del resistoma natural antártico, la actividad humana favorece el enriquecimiento y la dispersión de bacterias resistentes y de sus determinantes genéticos en estos ecosistemas.

Si bien no existen estudios sistemáticos que evalúen la presencia o transformación de fluoroquinolonas en bahías específicas del Estrecho de Magallanes, la combinación de condiciones ambientales frías, baja disponibilidad de carbono y potencial ingreso episódico de compuestos antropogénicos plantea interrogantes sobre las capacidades funcionales de su microbiota. En sistemas oligotróficos, la disponibilidad de sustratos orgánicos puede modular la actividad metabólica y favorecer procesos de transformación incidental de moléculas persistentes.

En este contexto, considerando la elevada persistencia ambiental y la naturaleza recalcitrante de ciprofloxacino (capacidad de un compuesto para resistir la degradación biológica o química en el ambiente) y la evidencia previa que sugiere que su transformación ocurre predominantemente bajo esquemas de co-metabolismo, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo: ***bacterias aisladas desde ambientes subantárticos podrían exhibir capacidad de tolerancia y/o transformación parcial de ciprofloxacino bajo condiciones experimentales controladas, particularmente en presencia de fuentes adicionales de carbono que adapten su actividad metabólica.***

2 Hipótesis

Aislados bacterianos provenientes de bahías subantárticas sujetas a presión antropogénica presentan capacidad para tolerar ciprofloxacino y promover su biotransformación parcial mediante procesos co-metabólicos dependiente de la disponibilidad de carbono.

3 Objetivo general

Evaluar el potencial metabólico de aislados bacterianos provenientes de bahías subantárticas sujetas a presión antropogénica para tolerar y biotransformar ciprofloxacino bajo condiciones experimentales controladas.

3.1 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar bacterias provenientes de bahías subantárticas sujetas a presión antropogénica, y caracterizar su perfil de susceptibilidad a antibióticos, con énfasis en ciprofloxacino.
2. Evaluar la capacidad de crecimiento y tolerancia de los aislados bacterianos en presencia de ciprofloxacino bajo diferentes condiciones de disponibilidad de carbono.
3. Evaluar el potencial funcional y genómico de cepas seleccionadas para tolerar y biotransformar ciprofloxacino, mediante ensayos de actividad antimicrobiana residual y análisis de secuenciación de genoma completo.

4 Metodología

4.1 Sitios de estudio

En septiembre de 2021, durante una expedición científica en el Estrecho de Magallanes, se seleccionaron dos bahías subantárticas bajo influencia marina y con evidencia visible de presión antropogénica costera. El primer sitio se nombró Dos Lobos, ubicado en las Islas Charles ($53^{\circ}45'15.6''$ S; $72^{\circ}05'32.2''$ O), cercana al Parque Nacional Marino Francisco Coloane. El segundo sitio correspondió a Puesto Pomar, localizado en el Seno Otway ($53^{\circ}15'38.2''$ S; $79^{\circ}10'49.6''$ O), en las proximidades del Parque Nacional Kawésqar (Figura 1). En ambos sectores se observó acumulación de residuos sólidos en la zona de varamiento asociada a la línea de la alta marea, lo que fue considerado como antecedente cualitativo de intervención antrópica. Estas observaciones fueron documentadas mediante registro fotográfico georreferenciado durante la campaña.

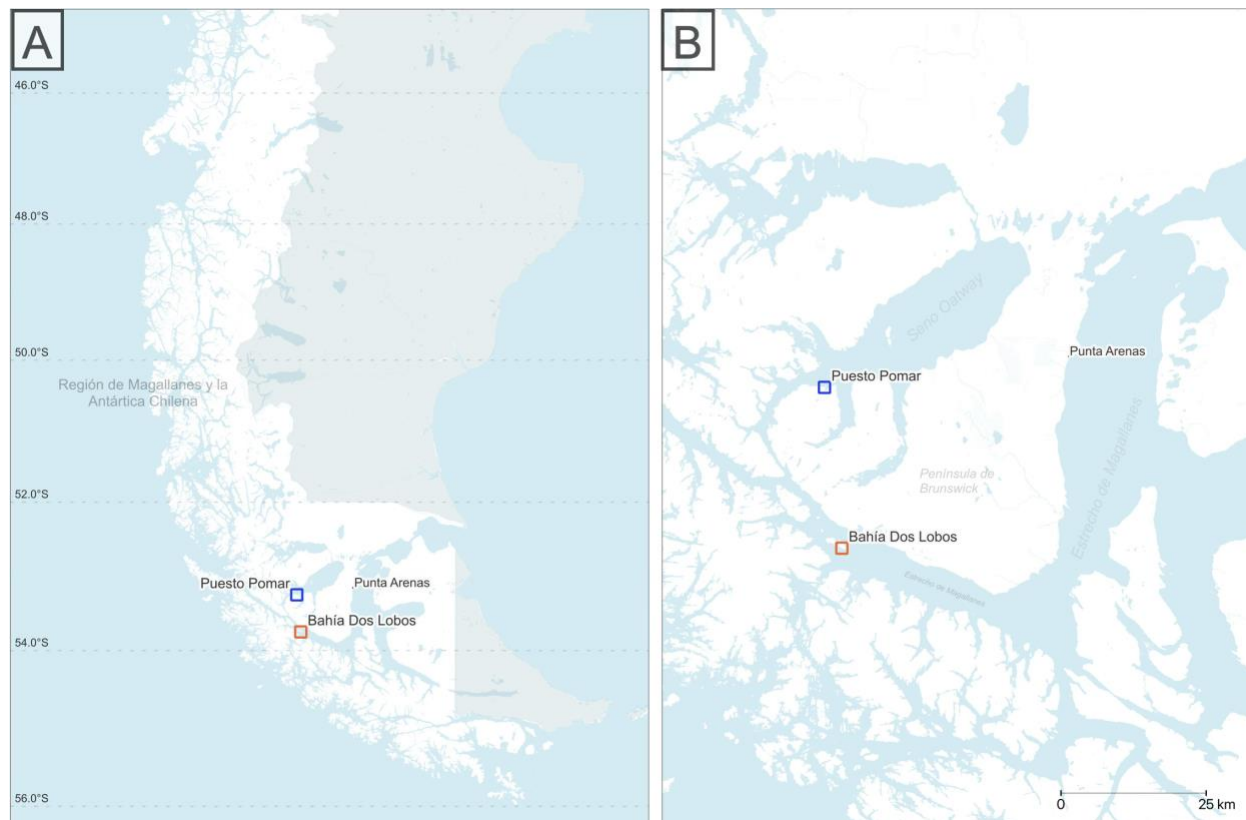


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en subantártica.

(A) Localización regional de bahía Dos Lobos y Puesto Pomar en la Región de Magallanes y la Antártica Chilena. (B) Acercamiento geográfico de los sitios de muestreo en relación con el Seno Oatway y Punta Arenas. Los cuadros indican donde se encuentran las bahías seleccionadas durante la expedición. Fuente: Elaboración propia generada en QGIS (versión 3.40.5-Bratislava).

4.2 Recolección de muestras y aislamiento de bacterias

En cada bahía se obtuvieron tres muestras independientes de sedimento superficial y una muestra de agua de mar. Las muestras de sedimento, de matriz predominantemente

arenosa, fueron recolectadas a lo largo de un transecto lineal, desde la zona de baja mar hasta el límite de la vegetación costera, en puntos equidistantes de 15 m aproximadamente, lo que permitió capturar la variabilidad espacial a pequeña escala dentro de cada sitio. Las muestras de agua de mar se recolectaron desde la zona central de cada bahía en una embarcación menor, utilizando contenedores estériles con una capacidad de 2 L. En cada punto de muestreo se registraron *in situ* la temperatura y el pH, utilizando un termómetro digital y un pH-metro portátil debidamente calibrado.

El procesamiento microbiológico primario para el aislamiento bacteriano se realizó inmediatamente después de la recolección, a bordo de la embarcación de la expedición, con el fin de minimizar alteraciones en la viabilidad de las bacterias cultivables. Para ello, 5 g de sedimento húmedo fueron suspendidos en agua ultrapura estéril en proporción 1:10 (p/v) y homogenizados en agitador durante 10 min a máxima velocidad. Posteriormente, la suspensión se dejó decantar brevemente y la fracción sobrenadante fue filtrada a través de membranas estériles de 0,45 µm de tamaño de poro. En el caso de las muestras de agua de mar, se filtraron directamente 2 L por la misma membrana. Las membranas obtenidas fueron depositadas sobre agar cromogénico (Medio Cromogénico E. coli-Coliformes, Condalab, Cat.:1340) e incubadas en condiciones aerobias a ~25 °C durante 36 h. Posteriormente, las placas fueron trasladadas al laboratorio del Instituto Antártico Chileno (INACH), donde se realizó la selección de colonias considerando criterios morfológicos y cromogénicos, incluyendo tamaño, forma, borde, elevación, textura y coloración de las colonias desarrolladas en el agar cromogénico, de acuerdo con las propiedades diferenciales del medio. Las colonias que presentaron

morfotipos y tonalidades distintas fueron repicadas individualmente en agar Luria-Bertani (Oxoid) inclinado y enviadas al Laboratorio de Investigación en Agentes Antimicrobianos (LIAA) de la Universidad de Concepción.

En el LIAA, los aislados transportados en agar inclinado fueron reactivados mediante siembra en agar MacConkey (Oxoid) e incubados a 15 °C y 30 °C por 24 a 36 h, con el fin de evaluar su crecimiento a distintas temperaturas y seleccionar aquellas condiciones que permitieran un desarrollo óptimo. A partir de las colonias obtenidas, se realizaron sucesivos repiques para asegurar la obtención de cultivos axénicos. La pureza de los aislados fue corroborada mediante tinción de Gram y observación microscópica.

Una vez confirmada la pureza, los aislados fueron preservados mediante crioconservación en caldo tripticasa de soya (Oxoid) suplementado con glicerol estéril al 20% (v/v) y almacenados a -80 °C. Finalmente, el cepario quedó constituido por 67 cepas bacterianas viables y purificadas, las cuales fueron utilizadas para los análisis fenotípicos y moleculares subsecuentes.

4.3 Análisis fisicoquímico del sedimento

La caracterización fisicoquímica de las muestras de sedimento se realizó en la ciudad de Punta Arenas, previo al traslado definitivo del material biológico a Concepción. Durante la recolección de las muestras se registró la temperatura del sedimento *in situ* utilizando un termómetro digital para suelo. El pH fue determinado suspendiendo aproximadamente 10 g de sedimento en 30 mL de agua ultrapura, homogenizando la mezcla en agitador

durante 5 min y midiendo posteriormente con pH-metro portátil previamente calibrado (Zagal, 2007).

Posteriormente, en el Laboratorio de Química de la Universidad de Magallanes, en Punta Arenas, se determinó el porcentaje de humedad y el contenido de materia orgánica de las muestras, siguiendo la metodología de Zagal (2007). Para ello, se pesaron 10 g de sedimento por muestra y se sometieron a secado en estufa a 45 °C durante 24 h para la determinación del contenido de humedad. Luego del secado, las muestras fueron pesadas nuevamente y el porcentaje de humedad se calculó gravimétricamente. A continuación, el material seco fue incinerado a 600 °C durante 2 h en una mufla para la cuantificación de materia orgánica, registrándose el peso final tras enfriamiento en un desecador. El contenido de materia orgánica fue calculado a partir de la pérdida de peso por ignición. Finalmente, los recuentos microbiológicos fueron normalizados y expresados como unidades formadoras de colonias por gramo de sedimento seco (UFC g⁻¹), corrigiendo los valores en función del porcentaje de humedad previamente determinado.

4.4 Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad de los aislados bacterianos a los antibióticos se evaluó mediante el método de difusión en disco en agar Mueller-Hinton (MH) (Oxoid). Previamente, los aislados fueron cultivados en agar Tripticasa de soya (TSA) (Oxoid) a 30 °C durante 24–36 h. A partir de colonias frescas, se prepararon suspensiones bacterianas en agua estéril, ajustando la turbidez a 0,5 unidades de la escala de McFarland utilizando un turbidímetro (Oxoid), equivalente a $\sim 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Se evaluó la susceptibilidad frente a nueve antibióticos: ampicilina (AMP, 10 µg), amikacina (AMK, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefuroxima (CXM, 30 µg), ciprofloxacino (CIP, 5 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), sulfonamida (SUL, 300 µg; disco S3) y tetraciclina (TET, 30 µg), utilizando discos comerciales (Oxoid). La actividad antibacteriana se registró midiendo el diámetro de los halos de inhibición en milímetros utilizando un pie de metro.

Se consideraron no susceptibles aquellos aislados que presentaran halos de inhibición $\leq$ 14 mm, de acuerdo con el criterio adoptado en estudios previos de bacterias ambientales (Jara et al., 2020). La cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922 fue empleada como control de calidad para verificar el correcto desempeño del ensayo de susceptibilidad.

El índice de resistencia antibiótica (IRA) fue calculado según la fórmula propuesta por Krumperman (1983), el cual corresponde a la proporción entre el número de antibióticos frente a los cuales el aislado no mostró susceptibilidad y el número total de antibióticos evaluados. Asimismo, el índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) fue estimado siguiendo la metodología descrita por Osundiya et al. (2013), como indicador del grado de exposición ambiental a agentes antimicrobianos.

4.5 Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído a partir de 67 aislados bacterianos utilizando el método de ebullición con precipitación alcohólica. Colonias de cultivos en placa frescos fueron suspendidas en 50 µL de agua ultrapura estéril sometidas a incubación a 95 °C durante

5 min para lisis celular. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 10 min a 4°C , recuperando el sobrenadante.

El ADN fue precipitado mediante la adición del volumen necesario de etanol absoluto grado biología molecular (Merck), previamente almacenado a -20°C , para alcanzar una concentración final aproximada al 70 % (v/v), considerando el volumen inicial del sobrenadante ($\sim 50 \mu\text{L}$), seguido de centrifugación a $10.000 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sedimento obtenido fue lavado en dos ocasiones con etanol al 70 % (v/v), también almacenado a -20°C , bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, el ADN fue secado a temperatura ambiente para remover trazas de etanol y rehidratado en agua ultrapura grado biología molecular (Invitrogen) para su posterior utilización.

La concentración y la pureza del ADN extraído fueron determinadas mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un lector de microplacas (Tecan), registrándose las relaciones $A_{260/280}$ como indicador de pureza del ADN.

4.6 Identificación molecular de los aislados bacterianos

La identificación de los aislados bacterianos se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, utilizando los partidores universales 27F y 1492R, que generan un fragmento de amplificación aproximado de 1.400 pb (Pollock et al., 2018). Las reacciones de PCR se utilizó la enzima GoTaq® G2 *Hot Start Green Master Mix* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La temperatura de alineamiento utilizada en las reacciones fue de 57°C . En cada corrida se incluyó un

control negativo sin ADN templado (agua ultrapura) para descartar contaminación de los reactivos y los partidores.

Los productos de amplificación fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,8 % y posteriormente enviados a Macrogen, Chile, para su secuenciación por el método de Sanger, utilizando los mismos partidores empleados en la amplificación. Las secuencias obtenidas en sentido y antisentido fueron procesadas mediante el software *CLC Genomics Workbench* versión 22.0, donde se realizó el control de calidad, recorte de extremos de baja calidad y ensamblaje con el propósito de obtener una secuencia consenso representativa de cada aislado.

Las secuencias consenso fueron comparadas utilizando la herramienta web *SINA aligner* disponible en la plataforma SILVA y comparados contra la base de datos SILVA versión 138 (Quast et al., 2013). Para cada secuencia consenso, el análisis se ejecutó utilizando el parámetro *number of neighbors per query sequence* establecido en 100, recuperándose las secuencias de referencia más cercanas para cada consulta. La asignación taxonómica se realizó considerando el porcentaje de identidad de secuencia, aplicando un umbral ≥ 97 % como criterio mínimo para una identificación confiable a nivel de género.

4.7 Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR

La detección de genes asociados con la resistencia a antibióticos se realizó mediante PCR convencional utilizando el ADN genómico obtenido de manera similar a la descrita previamente. Las reacciones de amplificación se prepararon utilizando la enzima

GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los genes evaluados incluyeron determinantes asociados a resistencia a quinolonas, integrones, sulfonamidas, β -lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles y tetraciclinas. La lista completa de genes, partidores, tamaños esperados y T° de alineamiento se indican en el Anexo 1.

En cada reacción se incluyó un control negativo sin ADN templado (agua ultrapura) con el fin de descartar contaminación de reactivos y partidores. Cuando fue posible, se utilizaron como controles positivos ADN genómicos provenientes de cepas previamente caracterizadas y secuenciadas en el laboratorio (LIAA), portadoras de los genes de resistencia evaluados. Para todos los genes, la validez de la reacción se verificó mediante la inclusión del control negativo correspondiente al ADN de *E. coli* ATCC® 25922, cepa de referencia sensible a antibióticos, empleada como control negativo de referencia para los genes evaluados.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1,8-2,0 %), utilizando GelRed (Biotium) como agente intercalante y visualizados en transiluminador UV (Cambridge). El tamaño de los amplicones obtenidos fue comparado con un marcador de tamaño molecular.

4.8 Preparación de la solución stock de ciprofloxacino (CIP)

En todos los ensayos se utilizó CIP de grado analítico, PHR1167, Sigma-Aldrich. Debido a su limitada solubilidad en agua, el antibiótico fue inicialmente disuelto en 500 μL de HCl 0,1 N y posteriormente ajustado con agua Mili-Q hasta obtener un volumen final de 1 mL, obteniéndose una solución stock de 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de esta solución se prepararon las diluciones correspondientes para los distintos ensayos microbiológicos.

Durante el desarrollo de los experimentos se utilizaron dos lotes del mismo reactivo (Sigma-Aldrich), correspondientes a los números de lote LRAC6450 y 0000189373. La solución stock de CIP fue preparada fresca previo a cada ensayo para minimizar posibles procesos de degradación del compuesto.

4.9 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria para ciprofloxacino (CIP)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para CIP se determinó mediante el método de dilución en agar. Para ello, se prepararon placas de agar MH (Oxoid) suplementadas con CIP (Sigma-Aldrich) a concentraciones crecientes de 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Las suspensiones bacterianas se prepararon a partir de cultivos frescos y se ajustaron a una turbidez equivalente a 0,5 unidades de la escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC mL^{-1}). Posteriormente, las suspensiones fueron diluidas a una concentración aproximada de 10^6 UFC mL^{-1} y se inocularon sobre la superficie del agar utilizando un replicador de Steers. Las placas se incubaron en condiciones aerobias a 30 °C durante 24-36 h, o hasta observar crecimiento visible en la placa control sin antibiótico.

La CMI se definió como la concentración mínima de ciprofloxacino capaz de inhibir completamente el crecimiento visible del aislado bacteriano. Como control de calidad del ensayo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC® 25922. Para efectos descriptivos, se consideró tolerancia a CIP como la capacidad de una cepa para crecer en al menos una de las concentraciones evaluadas del antibiótico bajo las condiciones experimentales utilizadas.

4.10 Evaluación del crecimiento en presencia de ciprofloxacino (CIP) bajo fuente de carbono disponible

La capacidad de los aislados bacterianos para crecer en medio mínimo M9 bajo distintas condiciones de disponibilidad de carbono en presencia de CIP, se evaluó mediante ensayos de microdilución en microplacas de 96 pocillos.

Se analizaron 67 aislados, evaluándose cada condición por duplicado. Los ensayos se realizaron en un volumen final de 200 μL por pocillo, utilizando medio mínimo M9 suplementado con glucosa ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), acetato de sodio ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) como fuentes adicionales de carbono. Además, se incluyó una condición en la que el CIP fue incorporado en ausencia de otras fuentes adicionales de carbono, con el fin de evaluar la capacidad de crecimiento bajo dicha condición.

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en presencia de concentraciones crecientes de CIP (0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las placas se incubaron a 30 °C durante

5 días, registrándose la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) cada 24 h para monitorear el crecimiento bacteriano.

Se incluyeron controles positivos de crecimiento correspondientes a medio M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio en ausencia de CIP, así como controles sin fuente adicional de carbono.

4.11 Incubación de cepas seleccionadas para la evaluación posterior de actividad antimicrobiana residual de ciprofloxacino (CIP)

Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL protegidos de la luz, con un volumen final de cultivo de 100 mL de medio mínimo M9 (Merck). Las cepas evaluadas correspondieron a aquellas cepas que previamente mostraron crecimiento en presencia de CIP bajo condiciones definidas de disponibilidad de carbono. Adicionalmente, se evaluó un consorcio bacteriano compuesto por la mezcla de todas las cepas capaces de crecer en las condiciones definidas de carbono (10 cepas, Tabla 6), preparado a partir de suspensiones individuales ajustadas a 0,5 McFarland y combinadas en proporciones iguales (v/v) hasta un volumen final de 1 mL.

Las suspensiones bacterianas utilizadas para la inoculación se ajustaron a 0,5 unidades en la escala de McFarland, y para cada condición inoculada se añadió 1 mL de esta suspensión a los matraces correspondientes. El CIP se incorporó a una concentración equivalente a la última concentración que se observó crecimiento en el experimento

anterior (Tabla 6), con el fin de asegurar el crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico.

Se evaluaron distintas condiciones experimentales utilizando glucosa o acetato de sodio ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) como co-sustrato de carbono, además de condiciones en las que el CIP se encontraba como único compuesto orgánico adicional en el medio. En total se evaluaron diez condiciones experimentales que incluyeron tratamientos con bacterias y controles abióticos correspondientes: (i) medio M9 suplementado con glucosa y CIP, inoculado con la bacteria; (ii) medio M9 con glucosa, inoculado con la bacteria; (iii) medio M9 con glucosa, sin inoculación bacteriana; (iv) medio M9 suplementado con acetato de sodio y CIP, inoculado con la bacteria; (v) medio M9 con acetato de sodio, inoculado con la bacteria; (vi) medio M9 con acetato de sodio, sin inoculación bacteriana; (vii) medio M9 con CIP como único compuesto orgánico adicional inoculado con la bacteria; (viii) medio M9 con CIP sin inoculación bacteriana; (ix) medio M9 sin inoculación bacteriana y sin fuente adicional de carbono; y (x) medio M9 solo.

Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación constante a 110 rpm durante 10 días. El crecimiento bacteriano se monitoreó diariamente desde el tiempo 0 mediante DO_{600} , utilizando un lector de microplacas (Tecan) a partir de alícuotas de $200 \mu\text{L}$ analizadas por duplicado.

En cada punto de muestreo se recolectaron $1000 \mu\text{L}$ de cultivo, los cuales fueron centrifugados a $10.000 \times g$ a 4°C durante 7 min, con el fin de remover células

bacterianas. Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización en el bioensayo destinado a evaluar la actividad antimicrobiana residual del CIP.

4.12 Análisis de datos y generación de curvas de crecimiento

Los valores de DO_{600} fueron organizados por condiciones experimentales y tiempo de incubación. Cada punto temporal correspondió al promedio de dos mediciones técnicas obtenidas desde el mismo matraz. Debido a que no se dispuso de controles abióticos pareados para todas las condiciones combinadas con fuente de carbono y CIP, las curvas se representaron utilizando los valores crudos de DO_{600} . Los controles abióticos sin inoculación bacteriana se incorporaron en las gráficas como controles de esterilidad y referencia basal de absorbancia.

Como parámetros descriptivos de la cinética de crecimiento se registraron la DO_{600} máxima, el día en que ésta fue alcanzada, el incremento máximo de DO_{600} respecto al tiempo inicial y el día de crecimiento detectable. Este último se definió como el primer punto temporal en que el incremento de DO_{600} respecto al tiempo 0 fue $\geq 0,05$ y se mantuvo en la medición siguiente. Las figuras fueron generadas en Python, mediante las bibliotecas `pandas` y `matplotlib`.

4.13 Bioensayo para la evaluación de la actividad antimicrobiana residual de ciprofloxacino

Los sobrenadantes obtenidos durante los ensayos de incubación fueron utilizados para evaluar posibles cambios en la actividad antimicrobiana residual de ciprofloxacino mediante un bioensayo microbiológico. Para cada día de incubación se analizaron los sobrenadantes correspondientes a las distintas condiciones experimentales descritas previamente, incluyendo cultivos en el medio mínimo M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio en presencia o ausencia de ciprofloxacino y la bacteria, así como sus respectivos controles abióticos.

El bioensayo se realizó en duplicado para cada condición, utilizando la cepa *E. coli* ATCC® 25922 como cepa indicadora de la actividad antimicrobiana de CIP, cuya CMI es de 0,016 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Weinstein, 2019). Para cada muestra se utilizaron 30 μL de sobrenadante, los cuales fueron impregnados en discos de papel filtro estériles (Oxoid) para antibiogramas. La impregnación se realizó en dos aplicaciones sucesivas de 15 μL , permitiendo un intervalo de secado de 5-10 min entre cada adición para favorecer la absorción completa del líquido en el disco.

Los discos preparados fueron colocados sobre placas de agar Müller-Hinton (Oxoid) previamente inoculadas con una suspensión de *E. coli* ATCC® 25922 ajustada a 0,5 unidades de la escala de McFarland mediante turbidímetro (Oxoid). Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 h, tras lo cual se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados alrededor de cada disco.

Para controlar la variabilidad técnica entre los días del bioensayo, los halos de inhibición fueron transformados en una actividad antimicrobiana residual relativa. Para ello, se restó el diámetro basal del disco, correspondiente a 6 mm, tanto a los halos de las muestras como al halo del disco comercial de CIP (5 µg) (Ecuación 1). Posteriormente, el halo corregido de cada muestra fue dividido por el halo corregido del control comercial y multiplicado por 100. Las mediciones duplicadas realizadas desde un mismo sobrenadante fueron consideradas replicas técnicas y se expresaron como promedio con desviación estándar.

$$(1) \text{ Actividad residual relativa} = \left(\frac{\text{halo muestra} - 6\text{mm}}{\text{halo comercial} - 6\text{mm}} \right) \times 100$$

4.14 Secuenciación y ensamblaje de genomas completos

Con el fin de explorar el potencial genómico asociado a la respuesta frente a CIP, se seleccionaron tres cepas para secuenciación de genoma completo: DL38, DLAM9 y PP28. La selección consideró los resultados de la CMI, los perfiles de no susceptibilidad antimicrobiana y el crecimiento en medio mínimo M9 bajo condiciones definidas de carbono. DL38 y DLAM9 fueron seleccionadas como cepas capaces de crecer en M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio en presencia de CIP, mientras que PP28 fue incorporado como un aislado con CMI elevada de CIP en agar MH, pero sin crecimiento detectable en M9 con CIP bajo las condiciones evaluadas.

El ADN genómico fue extraído a partir de cultivos puros utilizando el kit DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN fue medida mediante espectrofotometría. Las muestras fueron

enviadas a Macrogen, Corea del Sur, para secuenciación mediante tecnología Illumina. La preparación de la biblioteca se realizó utilizando el Kit Nextera XT[®] DNA Library Preparation Kit (Illumina), seguido de secuenciación en plataforma NovaSeq X (Illumina), generando lecturas pareadas de 151 pb.

Las lecturas crudas fueron procesadas en la plataforma Galaxy Europe. En primer lugar, se realizó la eliminación de los adaptadores y el filtrado de calidad utilizando Trimmomatic (versión 0.39). Posteriormente, los genomas fueron ensamblados *de novo* mediante Unicycler (versión 0.5.1), utilizando el modo por defecto para lecturas Illumina. La calidad de los ensamblajes fue evaluada mediante QUAST (versión 5.3.0), considerando métricas como tamaño total del ensamblaje, número de *contigs*, N50, L50 y contenido de GC (%). La completitud y contaminación genómica fueron estimadas mediante CheckM2 (versión 1.1.0).

4.15 Identificación taxonómica basada en genoma completo

La identificación taxonómica de los aislados secuenciados se realizó mediante JSpecies (versión 5.0.3), utilizando análisis de la identidad nucleotídica promedio basada en BLAST (ANIb). La asignación taxonómica se realizó considerando la similitud genómica con genomas de referencia en la plataforma y el *Z-score* asociado al análisis.

4.16 Análisis genómico de genes asociados con resistencia a antibióticos, bombas de expulsión y permeabilidad de membranas.

Los genomas seleccionados fueron anotados mediante Prokka (versión 1.14.6). A partir de las anotaciones obtenidas se realizó una revisión dirigida a genes relacionados con dianas moleculares de fluoroquinolonas, sistemas de expulsión multidrogas, regulación transcripcional y permeabilidad de membrana externa.

La detección de genes de resistencia a antibióticos se realizó mediante ABRicate (versión 1.4.0), utilizando las bases de datos NCBI AMR, ResFinder y CARD, y se complementó con AMRFinderPlus (versión 3.12.8) con la base de datos v3.12-2024-05-02.2, disponibles en la plataforma Galaxy Europe. Los resultados fueron comparados considerando el gen detectado, cobertura, identidad, producto anotado y base de datos utilizada. Las detecciones obtenidas mediante CARD fueron interpretadas distinguiendo entre determinantes directos de resistencia y genes reguladores o componentes asociados indirectamente a resistencia, como sistemas de eflujo o regulación transcripcional.

La comparación entre cepas se realizó mediante procesamiento de los archivos de Prokka (.gff, .tsv, .faa y .fnn) y de los resultados de ABRicate y AMRFinderPlus en Python, utilizando `pandas` para organizar y comparar genes por nombre, producto funcional y categoría biológica. Cuando fue necesario se utilizó Biopython para extraer secuencias desde archivos .faa y .fnn. Las secuencias proteicas codificadas en los genes de *gyrA* y *parC* fueron revisadas de forma dirigida para evaluar sustituciones en las regiones QRDR

asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas, considerando los residuos críticos descritos para GyrA y ParC. En *Enterobacterales* se evaluaron las posiciones equivalentes a GyrA Ser83/Asp87 y ParC Ser80/Glu84, mientras que en *Pseudomonas* spp. se consideraron las posiciones descritas para GyrA Thr83/Asp87 y ParC Ser87 (Fàbrega et al., 2009).

5 Resultados

5.1 Caracterización ambiental de los sitios de estudio

Durante la expedición científica realizada en septiembre de 2021 en el Estrecho de Magallanes, se recolectaron muestras de sedimento y agua de mar en dos bahías costeras: Puesto Pomar, situado en el seno Otway, en las cercanías del Parque Nacional Kawésqar, y bahía Dos Lobos, ubicada en las islas Charles dentro del Parque Nacional Marino Francisco Coloane. En ambos sitios se observaron residuos sólidos acumulados o dispersos en sectores próximos a la línea de costa, incluyendo fragmentos plásticos, envases de alimentos, restos de material sintético y elementos compatibles con residuos asociados a actividad marítimas o pesquera. Estas observaciones fueron documentadas mediante registro fotográfico y se utilizaron como antecedente cualitativo para contextualizar la selección de los sitios de muestreo.

En Bahía Dos Lobos se evidenció una acumulación visible de residuos en la zona de varamiento, mezclados con macroalgas, madera y sedimento superficial (Figura 2 A-C). En Puesto Pomar, además de residuos dispersos en áreas cercanas a la vegetación costera, se observó una estructura rudimentaria próxima al borde costero, compatible con un uso humano ocasional del sector (Figura 2 D-F). De acuerdo con antecedentes locales obtenidos durante la expedición, este sitio sería utilizado ocasionalmente como refugio por pescadores; no obstante, esta información se considera solo como antecedente contextual. En conjunto, el registro visual documenta presencia de residuos sólidos de origen antrópico, aunque no se puede asegurar su procedencia.

Bahía Dos Lobos



Puesto Pomar



Figura 2. Registro visual de residuos sólidos e intervención local en los sitios de muestreo del Estrecho de Magallanes.

(A-C) Bahía Dos Lobos. (A) Vista general de la línea de costa con acumulación de residuos sólidos. (B) Acercamiento de fragmentos plásticos y material sintético depositados en zona de varamiento. (C) Detalle de un residuo plástico manufacturado encontrado entre macroalgas y material orgánico acumulado. (D-F) Puesto Pomar. (D) Estructura rudimentaria observada en las proximidades del sitio de muestreo. (E) Residuos plásticos dispersos sobre suelo y vegetación costera. (F) Vista del entorno inmediato del sitio de asentamiento en la zona transición costera con presencia de residuos plásticos.

Los parámetros fisicoquímicos del sedimento, medidos *in situ*, mostraron variación entre las dos áreas de estudio. En el sector Dos Lobos (sitios DL1, DL2, DL3 y DLAM), el pH del sedimento varió entre 7,99 y 8,44, mientras que la temperatura osciló entre 5,8 °C y 10,7 °C, entre los distintos puntos. En Puesto Pomar (sitios PP1, PP2, PP3 y PPAM), los valores de pH fluctuaron entre 7,90 y 8,18, y la temperatura entre 6,8 °C y 8,5 °C (Tabla 1). Además, el porcentaje de humedad del sedimento mostró variación entre las muestras analizadas (Figura 3A), mientras que el contenido de materia orgánica presentó valores bajos y relativamente acotados en ambos sitios (Figura 3B). Estos parámetros complementaron la caracterización ambiental inicial de los sedimentos utilizados en los análisis microbiológicos posteriores.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos registrados in situ en muestras de sedimento y agua de mar.

Sitio	Muestra	pH	Temperatura (°C)
Dos Lobos	DL1	7,99	6,4
	DL2	8,25	9,7
	DL3	8,44	10,7
	DLAM	8,10	5,8
Puesto Pomar	PP1	8,12	8,5
	PP2	7,90	6,8
	PP3	8,18	7,4
	PPAM	8,16	6,8

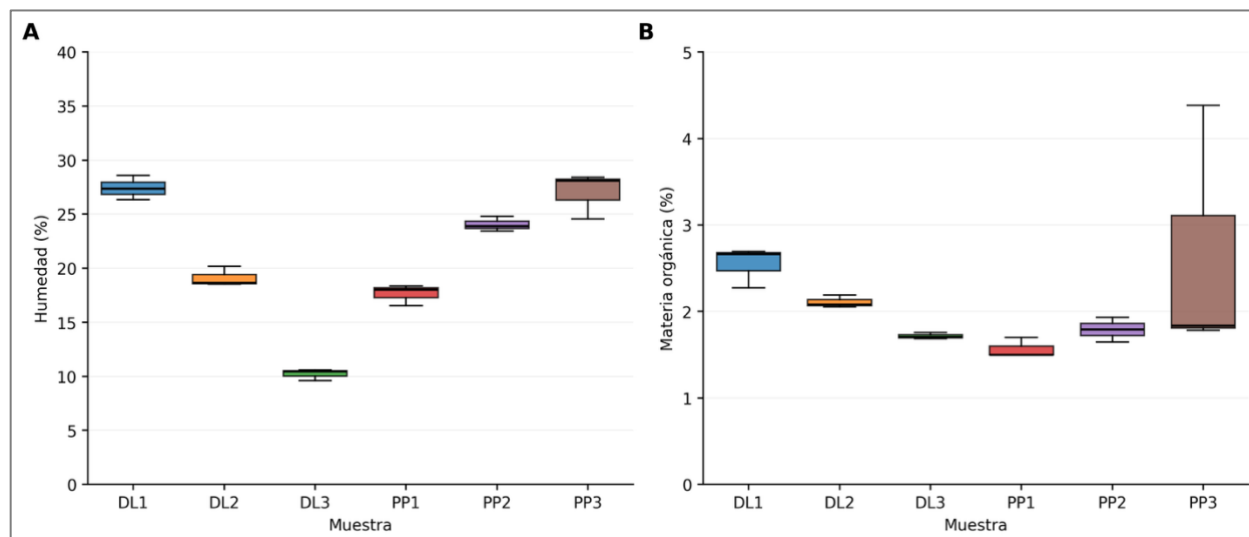


Figura 3. **Variación de humedad y materia orgánica en las muestras de sedimento.**

(A) Contenido de humedad y (B) porcentaje de materia orgánica en sedimentos de bahía Dos Lobos (DL) y Puesto Pomar (PP). Se muestran tres réplicas por muestra.

5.1 Aislamiento de cepas bacterianas

En las muestras de sedimento de la bahía Dos Lobos (DL), los recuentos de colonias en membrana oscilaron entre 33 y 37 colonias por muestra, mientras que en Puesto Pomar (PP) variaron entre 42 y 60 colonias. En agua de mar, la muestra correspondiente a DL presentó 98 colonias, equivalentes a 49 UFC/L, mientras que en PP se observó crecimiento confluyente, lo que impidió su cuantificación individual.

A partir de estas placas, se seleccionaron colonias representativas en base a criterios morfológicos y cromogénicos, obteniéndose entre 4 y 9 morfotipos en DL y entre 5 y 10 en PP. En PP1 se observó un crecimiento abundante de colonias con características

cromogénicas homogéneas, lo que sugiere una menor diversidad morfológica aparente bajo las condiciones de cultivo empleadas.

Los recuentos bacterianos en sedimento fueron normalizados respecto al peso seco equivalente, calculado a partir del contenido de humedad (Tabla 2), obteniéndose valores entre 7 y 9 UFC/g en DL y entre 11 y 23 UFC/g en PP. Dado que la normalización se basa en el peso seco, las diferencias en contenido de humedad deben considerarse en la interpretación de los valores UFC/g. No se observó una relación directa entre el contenido de humedad y los recuentos bacterianos entre las muestras analizadas.

Tabla 2. Integración del contenido de humedad y recuentos bacterianos en sedimento por peso seco.

Muestra	Humedad (%)	UFC/g sedimento
DL1	27,4	9
DL2	19,1	8
DL3	10,2	7
PP1	17,6	14
PP2	24,1	23
PP3	27,0	11

5.2 Identificación molecular de los aislados bacterianos.

La caracterización de los 67 aislados se efectuó mediante la amplificación y secuenciación del gen del ARNr 16S. Las secuencias consenso fueron alineadas contra la base SILVA versión 138, y se aplicó un valor de corte ≥ 97 % de identidad para la asignación taxonómica a nivel de género (Figura 4).

En la bahía DL se observaron diferencias en la composición de géneros entre las matrices analizadas. El sedimento, $n = 21$, los aislados fueron asignados principalmente a los géneros *Aeromonas* (38,1 %) y *Pseudomonas* (33,3 %), mientras que las secuencias sin clasificar alcanzaron 19,0 %. Los porcentajes restantes correspondieron a *Yersinia* y *Hafnia* (4,8 % cada uno). En agua de mar ($n = 12$), la composición estuvo dominada por los géneros *Escherichia* (41,7 %) y *Pseudomonas* (25,0 %); mientras que *Rahnella*, *Serratia*, *Yersinia* y la fracción sin clasificar, representaron 8,3 % cada uno.

En PP, los sedimentos ($n = 24$) presentaron una mayor proporción del género *Pseudomonas* (58,3 %), seguidos por secuencias sin clasificar (16,7 %) y del género *Serratia* (12,5 %). Los géneros *Rahnella*, *Hafnia* y *Oceanisphaera* representaron 4,2 % cada uno. En agua de mar ($n = 12$), el género *Pseudomonas* correspondió al 58,3 %, seguido por *Lelliottia* y la fracción sin clasificar (16,7 % cada una), mientras que *Rahnella* representó 8,3 %.

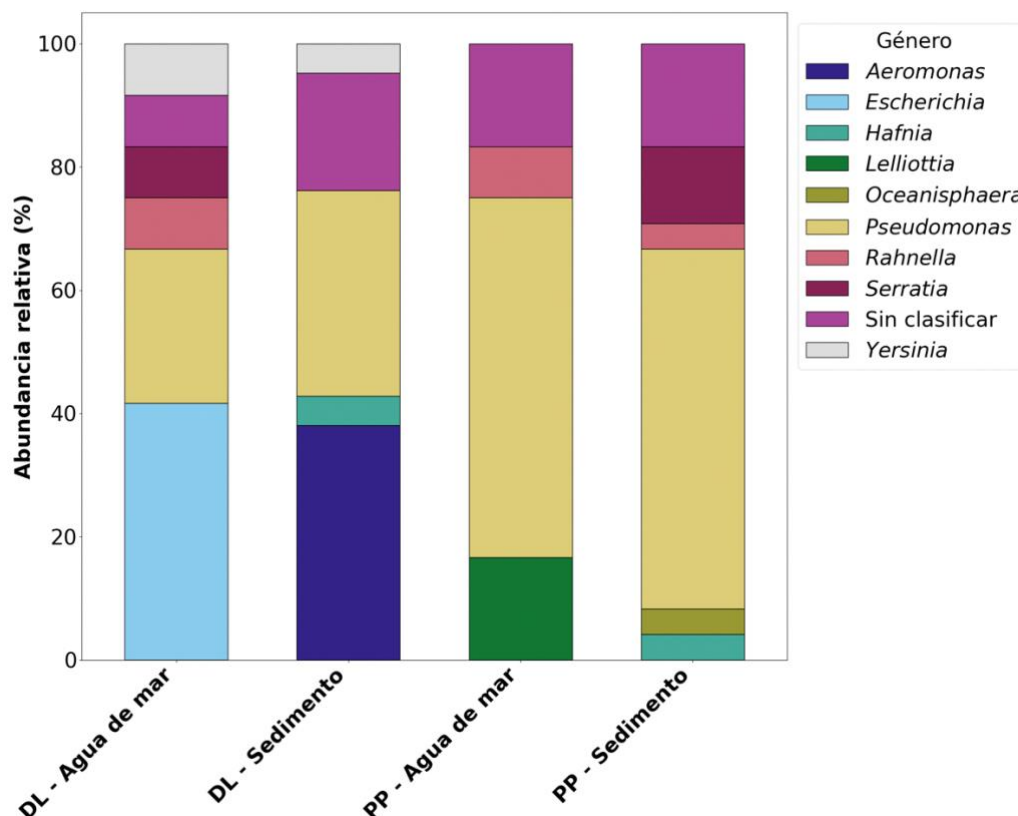


Figura 4. Composición relativa de géneros bacterianos aislados desde muestras de agua de mar y sedimento de bahía Dos Lobos (DL) y Puesto Pomar (PP).

5.3 Evaluación de la susceptibilidad a antibióticos

Se evaluó la susceptibilidad de 67 aislados frente a nueve antibióticos mediante el método de difusión en disco. En DL, $n = 32$, los menores porcentajes de susceptibilidad se observaron para AMP, CXM y CHL, mientras que para AMK, CIP y TET se observaron mayores porcentajes de cepas susceptibles (Figura 5A). En PP, AMP, CXM y CHL también correspondieron a los antibióticos con menores porcentajes de cepas susceptibles, mientras que para AMK, TET e IPM se presentaron porcentajes más elevados de cepas no susceptibles (Figura 5A).

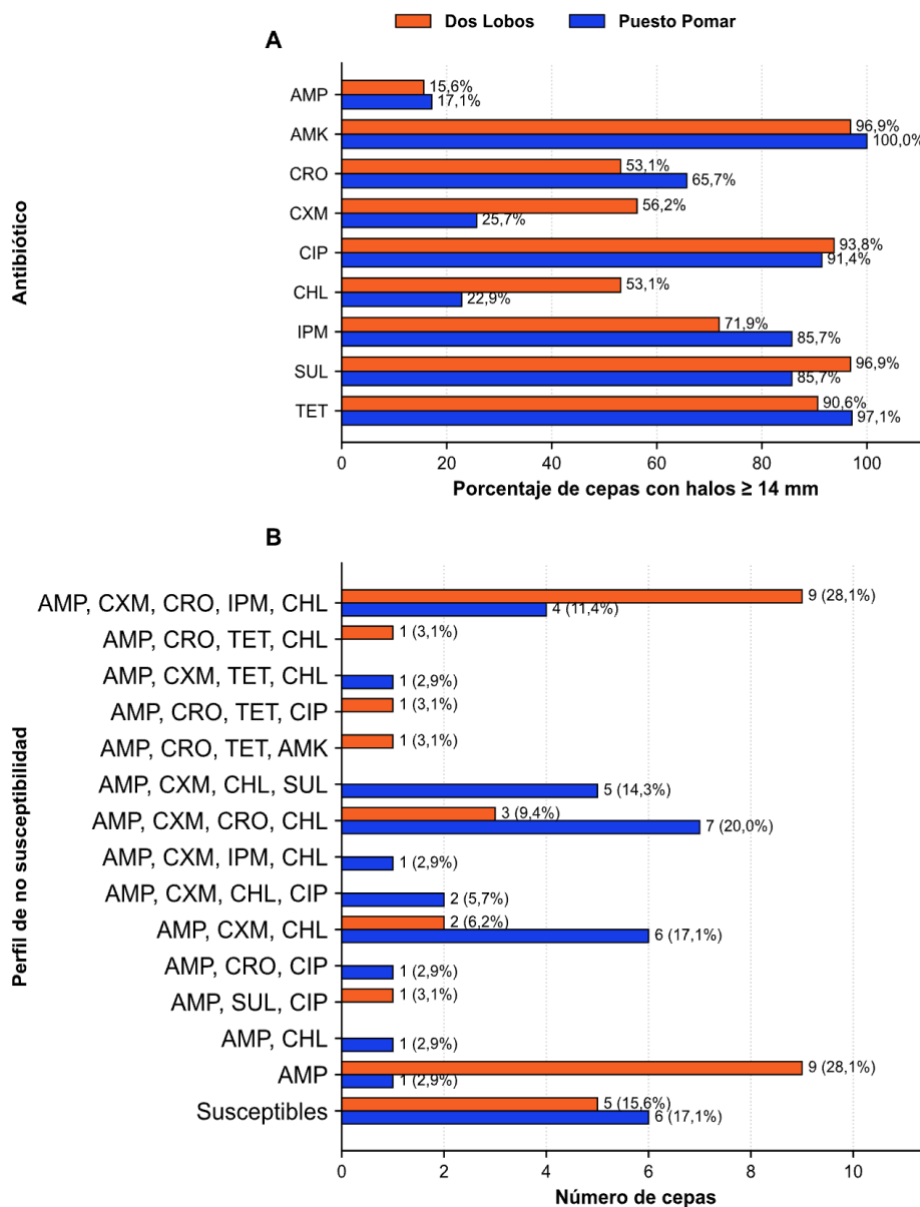


Figura 5. **Susceptibilidad a antibióticos y distribución de los perfiles de no susceptibilidad (halos de inhibición ≤ 14 mm) en aislados bacterianos provenientes de las bahías Dos Lobos y Puesto Pomar.**

(A) Porcentaje de aislados con halos de inhibición ≥ 14 mm frente a cada antibiótico evaluado. (B) Número de aislados agrupados según su perfil de no susceptibilidad (halos de inhibición ≤ 14 mm). Los porcentajes fueron calculados considerando 32 aislados de DL y 35 aislados de PP.

El análisis de los perfiles fenotípicos evidenció la presencia de 14 combinaciones distintas de halos ≤ 14 mm entre los aislados (Figura 5B). En DL, se identificaron perfiles de no susceptibilidad que involucraron cuatro o más antibióticos, incluyendo combinaciones como AMP-CXM-TET-CHL y AMP-CXM-IPM-CHL, observadas principalmente en aislados de *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Tabla 3).

En PP, también se observaron perfiles con múltiples no susceptibilidades, destacando combinaciones como AMP-CXM-CRO-IPM-CHL y AMP-CXM-TET-CHL-SUL. Estos perfiles se asociaron principalmente a aislados pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas*, así como *Rahnella*, *Serratia* y aislamientos sin clasificar. En ambos sitios se identificaron aislados susceptibles a todos los antibióticos evaluados. En DL, estos correspondieron a *Escherichia*, mientras que en PP se asociaron *Lelliota*, *Hafnia*, *Oceanisphaera*, *Serratia* y aislados no clasificados (Tabla 3).

Tabla 3. **Perfiles de no susceptibilidad (halos de inhibición ≤ 14 mm) y géneros bacterianos asociados en aislados de Dos Lobos y Puesto Pomar.**

Perfil de no susceptibilidad	Género asociado en Dos lobos	Género asociado en Puesto Pomar
AMP, CXM, CRO, IPM, CHL	<i>Pseudomonas</i> (4), <i>Aeromonas</i> (2), Sin clasificar (3)	<i>Pseudomonas</i> (3), Sin Clasificar (1)
AMP, CRO, TET, CHL	<i>Pseudomonas</i> (1)	-
AMP, CXM, TET, CHL	-	<i>Pseudomonas</i> (1)
AMP, CRO, TET, CIP	Sin Clasificar (1)	-
AMP, CRO, TET, AMK	<i>Pseudomonas</i> (1)	-
AMP, CXM, CHL, SUL	-	<i>Pseudomonas</i> (1), <i>Rahnella</i> (1), Sin clasificar (3)
AMP, CXM, CRO, CHL	<i>Pseudomonas</i> (1), <i>Aeromonas</i> (1), Sin Clasificar (1)	<i>Pseudomonas</i> (6), Sin clasificar (1)
AMP, CXM, IMP, CHL	-	<i>Pseudomonas</i> (1),
AMP, CXM, CHL, CIP	-	<i>Pseudomonas</i> (1), <i>Lelliottia</i> (1)
AMP, CXM, CHL	<i>Pseudomonas</i> (2)	<i>Pseudomonas</i> (3), <i>Serratia</i> (1), Sin Clasificar (2)
AMP, CRO, CIP	-	<i>Pseudomonas</i> (1)
AMP, SUL, CIP	<i>Aeromonas</i> (1)	-
AMP, CHL	-	<i>Pseudomonas</i> (1)
AMP	<i>Aeromonas</i> , (4) <i>Yersinia</i> , (1) Sin clasificar (4)	<i>Pseudomonas</i> (1)
Susceptibles a todos los antibióticos	<i>Pseudomonas</i> (1), <i>Hafnia</i> (1), <i>Escherichia</i> (3)	<i>Lelliottia</i> (1), <i>Rahnella</i> (1), <i>Hafnia</i> (1), <i>Serratia</i> (1), <i>Oceanisphaera</i> (1), Sin Clasificar (1),

Los números entre paréntesis indican la cantidad de aislados asociados a cada género dentro de cada perfil.

El índice MAR mostró una distribución variable entre los aislados de ambos sitios, considerando halos de inhibición ≤ 14 mm (Tabla 4). En DL, el 56,3 % de los aislados presentó valores de MAR $> 0,2$, mientras que en PP esta proporción alcanzó el 77,1%. Los valores de MAR oscilaron entre 0 y 0,6 en ambos sitios. El IRA fue de 0,30 en DL y 0,34 en PP (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución del índice MAR e IRA en aislados bacterianos de bahía Dos Lobos y Puesto Pomar.

Dos Lobos			
Indice MAR	N° Aislados	Porcentaje	Porcentaje total
0,6	9	28,1	56,3
0,5	0	0	
0,4	6	18,8	
0,3	3	9,4	
0,2	0	0	
0,1	9	28,1	43,7
0	5	15,6	
IRA = 0,30			

Puesto Pomar			
Indice MAR	N° Aislados	Porcentaje	Porcentaje total
0,6	4	11,4	77,1
0,5	0	0	
0,4	16	45,7	
0,3	7	20	
0,2	1	2,9	
0,1	1	2,9	22,9
0	6	17,1	
IRA = 0,34			

5.4 Detección de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR convencional

Se evaluó la presencia de genes asociados a resistencia antimicrobiana mediante PCR convencional en los aislados bacterianos. No se detectaron amplicones del tamaño esperado para ninguno de los genes evaluados en las cepas analizadas (Anexo 1).

En algunos casos, se observaron bandas de tamaño inespecífico en los geles de electroforesis; sin embargo, estas no correspondieron al tamaño esperado para los genes blanco, por lo que no fueron consideradas como resultados positivos.

5.5 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino

La CMI de CIP se evaluó en 67 aislados bacterianos mediante el método de dilución en agar, utilizando un rango de concentraciones que varió entre 0,0625 y 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La cepa *E. coli* ATCC® 25922 se utilizó como control de calidad del ensayo.

De los aislados evaluados, 14 cepas presentaron crecimiento en al menos una de las concentraciones de CIP ensayadas. En estos aislados, el crecimiento se observó en concentraciones entre 0,125 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En los 53 aislados restantes, equivalentes al 79,1 % del total evaluado, no se observó crecimiento en ninguna de las concentraciones utilizadas, evidenciando inhibición completa bajo las condiciones del ensayo, es decir una CMI $\leq 0,0625 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Los aislados que crecieron en presencia de CIP provinieron de ambos sitios de muestreo, incluyendo sedimento y agua de mar (Tabla 5). Estos resultados permitieron identificar un subconjunto de aislados con capacidad de crecimiento frente a CIP en agar MH, los cuales fueron considerados para los ensayos posteriores en medio mínimo M9 bajo distintas condiciones de disponibilidad de carbono.

Tabla 5. **Concentración mínima inhibitoria (CMI) de ciprofloxacino en agar MH.**

Cepa	Sitio	Origen	Género	CMI CIP (µg/mL)	Perfil de no susceptibilidad
PP12	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,125	CRO-CXM-CHL-AMP
PP14	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,125	CRO-CXM-CHL-AMP
PP35R	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,125	CXM-CHL-TET-AMP
PP37C	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,125	CRO-CXM-CHL-AMP
PP15B	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,125	CRO-CIP-AMP
DL15	DL	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,25	CXM-CHL-AMP
DL32	DL	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	0,25	CXM-CHL-AMP
PPAM6	PP	Agua	<i>Pseudomonas</i>	0,25	CXM-CHL-AMP
PPAM7	PP	Agua	<i>Pseudomonas</i>	0,25	CXM-CHL-AMP
PPAM10B2	PP	Agua	<i>Pseudomonas</i>	0,25	IPM-CXM-CHL-AMP
PP32	PP	Sedimento	No clasificado	0,25	IPM-CIP-CRO-CHL-AMP
DL38	DL	Sedimento	<i>Aeromonas</i>	0,5	CRO-CXM-CHL-AMP
DLAM9	DL	Agua	<i>Pseudomonas</i>	1	IPM-CRO-CXM-CHL-AMP
PP28	PP	Sedimento	<i>Pseudomonas</i>	1	IPM-CRO-CXM-CHL-AMP

5.6 Crecimiento bacteriano en presencia de ciprofloxacino bajo distintas fuentes de carbono

Se evaluó el crecimiento de los aislados bacterianos en medio mínimo M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio en presencia de CIP. De las 67 cepas evaluadas, 10 mostraron crecimiento en al menos una de las condiciones ensayadas (Tabla 6).

El crecimiento se observó en todas las cepas cuando el medio fue suplementado con acetato de sodio, mientras que siete de ellas también presentaron crecimiento en medio suplementado con glucosa. En contraste, PP36, PP15B y DL21 mostraron crecimiento solo en la condición con acetato de sodio, evidenciando diferencias entre aislados en la respuesta frente a la fuente de carbono disponible.

Tabla 6. **Crecimiento bacteriano en distintas fuentes de carbono en presencia de ciprofloxacino.**

Cepa	Sitio	Género	Crecimiento en glucosa	Crecimiento en acetato	Concentración máxima de CIP ($\mu\text{g/mL}$)
PP36	PP	No clasificado	No	Sí	0,0625
DLAM8	DL	<i>Pseudomonas</i>	Sí	Sí	0,125
PP15B	PP	<i>Pseudomonas</i>	No	Sí	0,125
PP35R	PP	<i>Pseudomonas</i>	Sí	Sí	0,125
DL31	DL	No clasificado	Sí	Sí	0,25
DLAM5	DL	<i>Serratia</i>	Sí	Sí	0,25
DLAM9	DL	<i>Pseudomonas</i>	Sí	Sí	0,25
DL15	DL	<i>Pseudomonas</i>	Sí	Sí	0,25
DL21	DL	<i>Serratia</i>	No	Sí	0,5
DL38	DL	<i>Aeromonas</i>	Sí	Sí	0,5

La concentración máxima de CIP en la que se observó crecimiento varió entre 0,0625 y $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores más altos se observaron con los aislados DL21 y DL38, ambos con crecimiento hasta $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, DL21 creció únicamente en acetato, mientras que DL38 lo hizo en ambas fuente de carbono. Las cepas que presentaron crecimiento provinieron de ambos sitios de muestro e incluyeron aislados de sedimento y de agua de mar, con predominio de los géneros correspondientes a *Pseudomonas*, además de *Serratia*, *Aeromonas* y aislados no clasificados. No se observó crecimiento detectable cuando CIP fue incorporado como único compuesto orgánico adicional en el medio M9.

5.7 Dinámica de crecimiento de cepas seleccionadas en presencia de ciprofloxacino

Se evaluó la cinética de crecimiento de cuatro aislados bacterianos seleccionados y de un consorcio bacteriano bajo las distintas condiciones de carbono y CIP definidas

previamente. Las curvas de crecimiento evidenciaron diferencias en la magnitud y temporalidad del aumento de DO_{600} , asociadas principalmente a la fuente de carbono disponible y a la presencia del antibiótico (Figura 6).

En ausencia de CIP, los cultivos suplementados con glucosa o acetato de sodio presentaron incrementos tempranos de DO_{600} , observados principalmente durante las primeras 24 h de incubación. En las condiciones equivalentes suplementadas con CIP, el aumento de DO_{600} fue menor y más tardío, registrándose generalmente desde las 48 h. En contraste, en la condición M9 + CIP + bacteria, no se observaron incrementos sostenidos de DO_{600} compatibles con crecimiento detectable durante el periodo evaluado.

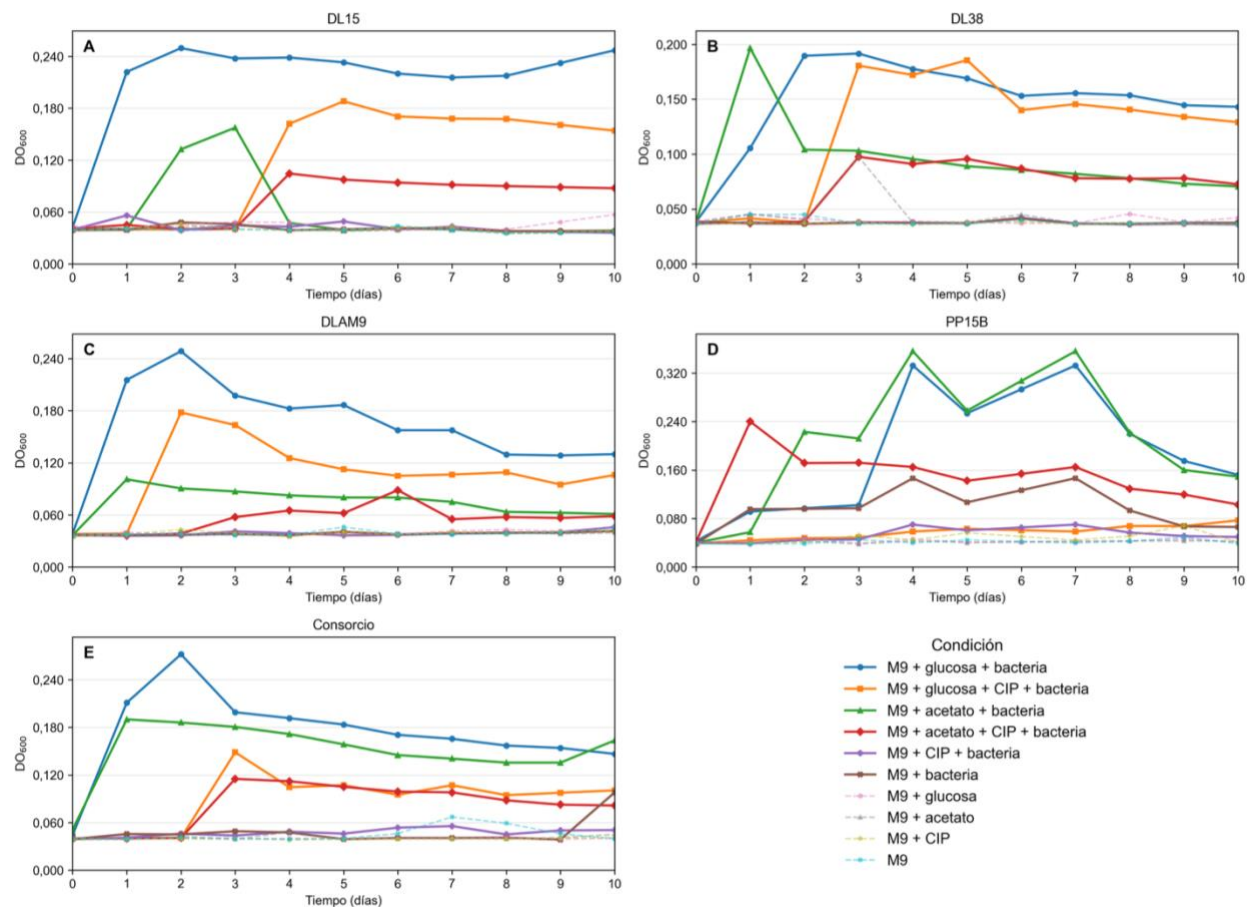


Figura 6. Dinámica de crecimiento de cepas seleccionadas y consorcio bacteriano bajo distintas condiciones de carbono y CIP.

Curvas de crecimiento de DL15 (A), DL38 (B), DLAM9 (C), PP15B (D) y el consorcio bacteriano (E) en medio mínimo M9 durante 10 días de incubación. Las líneas continuas corresponden a condiciones inoculadas y las líneas discontinuas a controles abióticos. Cada punto representa el promedio de dos mediciones técnicas de DO_{600} .

El análisis del incremento máximo de DO_{600} mostró que las condiciones sin CIP alcanzaron los valores más altos de crecimiento (Figura 7A). Las condiciones suplementadas con CIP y una fuente adicional de carbono presentaron incrementos

menores, aunque detectables en la mayoría de los cultivos evaluados. En cambio, la condición M9 + CIP + bacteria presentó valores de incremento máximo cercanos al nivel basal en todos los casos.

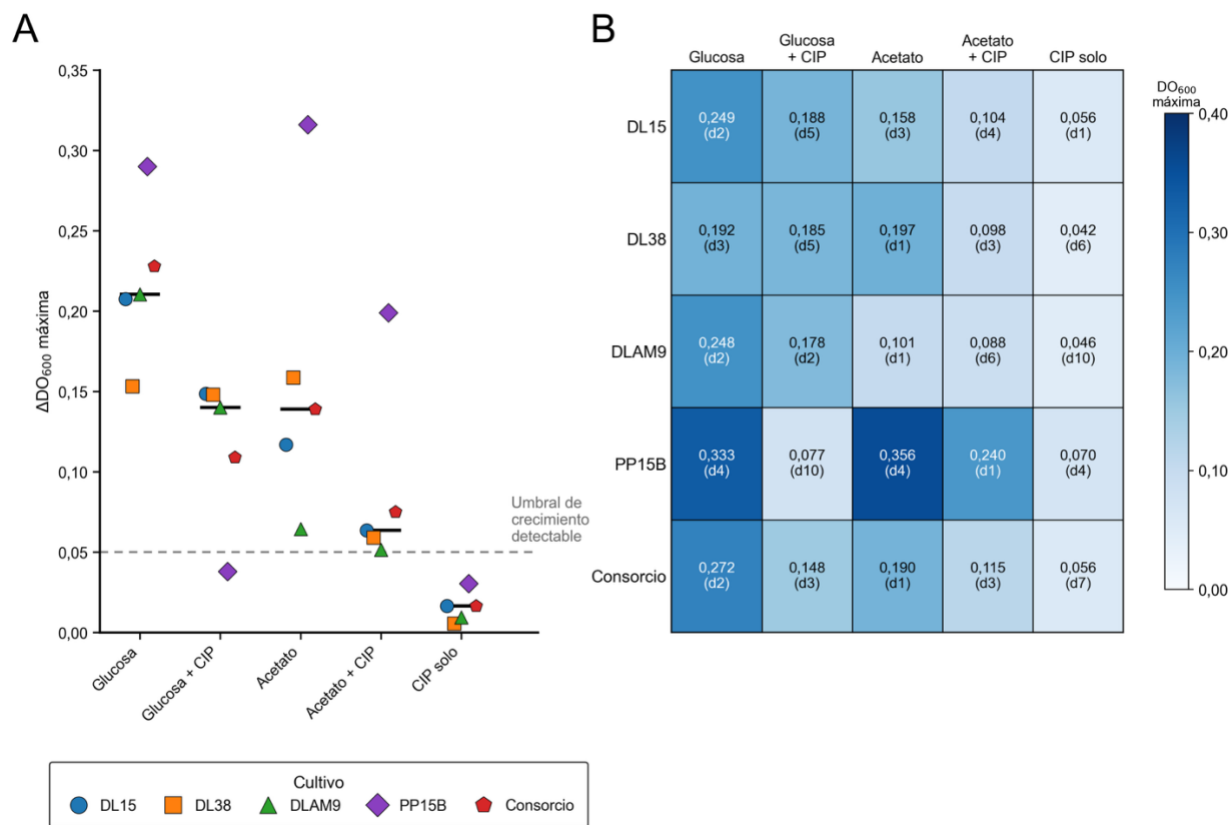


Figura 7. Crecimiento de cepas seleccionadas y consorcio bacteriano bajo distintas condiciones de carbono y ciprofloxacino.

(A) Incremento máximo de DO₆₀₀ respecto al tiempo inicial. Cada punto representa un cultivo y las líneas horizontales indican la mediana por condiciones. La línea discontinua señala el umbral operativo de crecimiento detectable. (B) Mapa de calor de la DO₆₀₀ máxima alcanzada por cada cultivo, entre paréntesis se indica el día en que alcanzó el valor máximo.

La magnitud y temporalidad del crecimiento variaron entre aislados (Figura 7B). En la mayoría de los cultivos, la glucosa se asoció con valores mayores de DO₆₀₀ máxima respecto del acetato de sodio; sin embargo, esta tendencia no fue uniforme. PP15B presentó un patrón diferenciado, con un incremento marcado en acetato + CIP y una respuesta limitada en glucosa + CIP (Figura 7B). El consorcio bacteriano mostró una dinámica comparable al rango observado para los aislados individuales, sin presentar una respuesta marcadamente distinta bajo las condiciones evaluadas.

5.8 Evaluación funcional de la actividad antimicrobiana residual en sobrenadantes de cultivos incubados con ciprofloxacino

La actividad antimicrobiana residual de los sobrenadantes obtenidos durante el ensayo de incubación con CIP fue evaluada como una aproximación funcional para evaluar si la incubación con bacterias se asocia con una disminución de la capacidad inhibitoria del antibiótico. Para ello, los halos de inhibición generados frente a *E. coli* ATCC® 25922 fueron expresados como actividad residual relativa, normalizada respecto al disco comercial de CIP de 5 µg. Esta normalización permitió comparar la actividad inhibitoria entre días y condiciones, reduciendo la influencia de variaciones técnicas propias del bioensayo (Figura 8).

En términos generales, los sobrenadantes de DL38, DLAM9 y del consorcio bacteriano mantuvieron actividad antimicrobiana residual detectable durante los 10 días de incubación (Figura 8A). En DL38, las condiciones con glucosa + CIP+ bacteria, acetato + CIP+ bacteria y M9 + CIP + bacteria, presentaron actividad residual detectable durante

el periodo evaluado, sin evidenciar una disminución progresiva de la actividad residual entre 0 d y 10 d. Un comportamiento similar se observó en DLAM9, donde la actividad inhibitoria relativa se mantuvo detectable, con variaciones temporales que no indicaron una pérdida funcional sostenida del antibiótico. En el consorcio bacteriano, la actividad residual también se mantuvo detectable durante el periodo de incubación, sin observarse una reducción clara al final de la incubación.

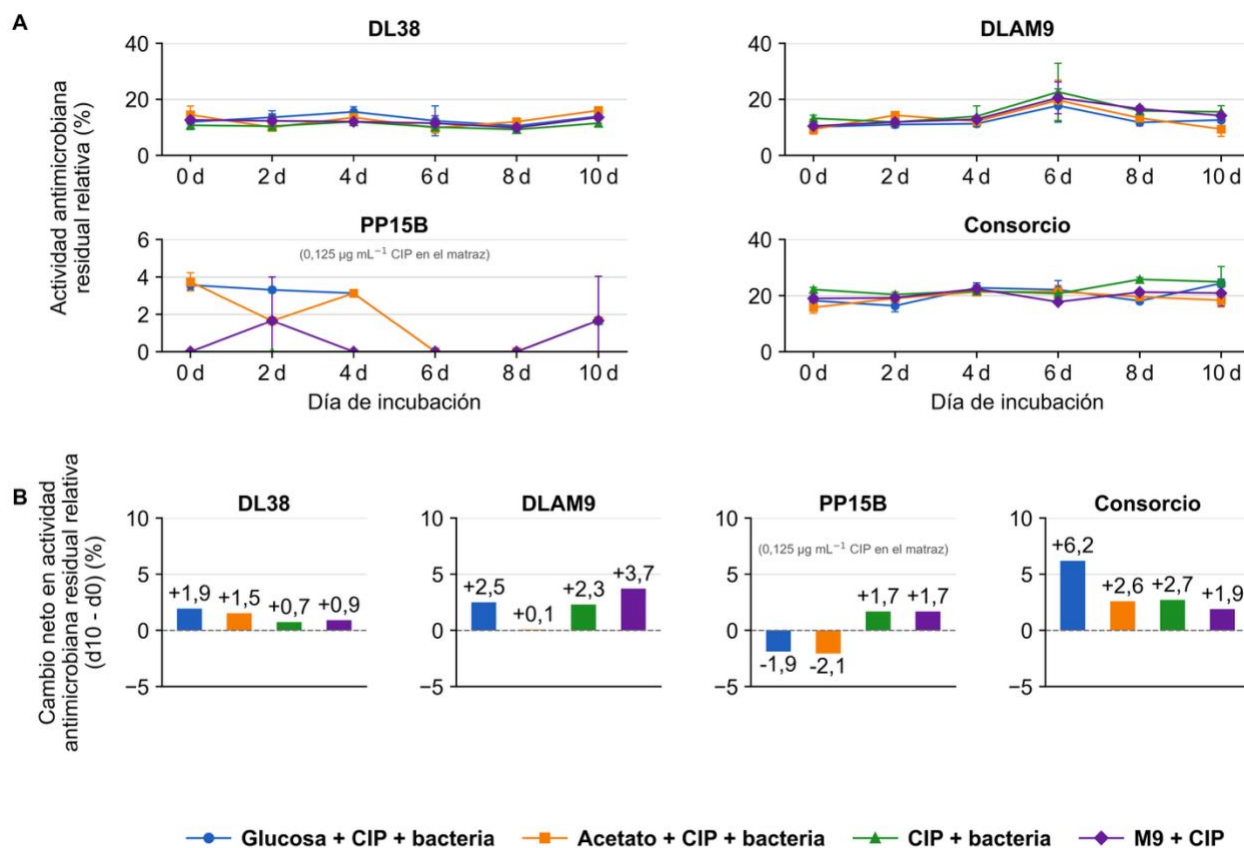


Figura 8. Actividad antimicrobiana residual relativa de los sobrenadantes obtenidos durante los ensayos de incubación con ciprofloxacino

(A) Variación temporal de la actividad residual relativa durante 10 días de incubación. (B) Cambio neto entre 10 d y 0 d para cada condición experimental. Los valores representan el promedio de duplicados técnicos; las barras de error indican desviación estándar

técnica. Los colores identifican las mismas condiciones experimentales en ambos paneles.

PP15B presentó valores bajos de actividad antimicrobiana residual relativa durante todo el ensayo. Este patrón debe interpretarse considerando que el matraz correspondiente a este aislado fue suplementado con una concentración inicial menor de CIP, equivalente a $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$. En consecuencia, los cambios observados en PP15B se encontraron cercanos al límite funcional de detección del bioensayo, lo que restringe la interpretación de variaciones pequeñas entre los días de incubación.

El análisis del cambio neto entre 10 d y 0 d mostró que la mayoría de las condiciones no presentó una reducción marcada de la actividad residual relativa (Figura 8B). En varios casos, los cambios fueron cercanos a cero o positivos, indicando mantención de la actividad inhibitoria en los sobrenadantes durante el periodo de incubación. Bajo las condiciones evaluadas, no se observó una disminución temporal consistente de la actividad antimicrobiana residual asociada a los cultivos bacterianos.

5.9 Caracterización genómica de cepas seleccionadas por su respuesta frente a ciprofloxacino

Se analizaron genómicamente tres cepas seleccionadas por presentar respuestas contrastantes frente a CIP: DL38, DLAM9 y PP28. La identificación taxonómica mediante JSpecies permitió refinar la asignación taxonómica obtenida por la secuenciación del gen del ARNr 16S. DL38 y DLAM9 fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens*, con un Z-score de 0,9995, mientras que PP28 fue identificada como *Serratia aquatilis*, con

un Z-score de 0,995. En consecuencia, la interpretación genómica posterior se realizó considerando la identificación basada en el genoma completo.

Los ensamblajes obtenidos presentaron métricas compatibles con análisis genómicos comparativos y de anotación funcional. DL38 y DLAM9 mostraron tamaños genómicos similares, cercanos a 6,1 Mb, contenido de GC de 60,05 %, completitud de 100 % y contaminación estimada de 0,08%. PP28 presentó un genoma de 5.533.473 pb, contenido de GC de 50,51 %, completitud de 100% y contaminación de 0,62 %. Las métricas de ensamblaje, calidad y anotación se resumen Tabla 7.

Tabla 7. Métricas de ensamblaje, calidad y anotación de los genomas de cepas seleccionadas.

Cepa	Identificación	Origen	Tamaño genoma (bp)	N° contigs	N50 (bp)	L50	GC (%)	CDS	tRNA	rRNA	Compleitud (%)	Contaminación (%)
DL38	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sedimento	6.100.330	116	191.839	11	60,05	5.400	59	4	100	0,08
DLAM9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Agua de mar	6.101.003	126	176.579	11	60,05	5.397	58	4	100	0,08
PP28	<i>Serratia aquatilis</i>	Sedimento	5.533.473	99	199.217	11	50,51	5.013	72	3	100	0,62

Las métricas de ensamblaje corresponden a QUAST; la completitud y contaminación a CheckM2; y los valores de CDS, tRNA y rRNA a Prokka.

Dado que DL38 y DLAM9 fueron asignadas a la misma especie, se compararon ambos genomas mediante ANIb. La comparación mostró una identidad nucleotídica promedio de 99,99 % con 99,86 % del genoma alineado, concordante con la asignación de ambos aislados a *P. fluorescens* (Tabla 8).

Tabla 8. Comparación genómica mediante ANIb entre DL38 y DLAM9.

Comparación	ANIb (%)	Genoma alineado (%)	Bases alineadas (bp)	Tamaño total considerado (bp)
DL38 vs DLAM9	99,99	99,86	6.091.770	6.100.330

5.10 Análisis de genes de resistencia, dianas de fluoroquinolonas y sistemas de expulsión

El análisis mediante ABRicate y AMRFinderPlus identificó un conjunto específico de genes asociados a resistencia antimicrobiana o a funciones relacionadas con sistemas de expulsión, regulación y respuesta antimicrobiana en las cepas evaluadas. Los resultados se presentan en la Tabla 9, indicando la herramienta o base de datos de detección, la cobertura, la identidad y la función reportada según la base de datos.

El gen que codifica para *bla*_{PFM-3} fue detectado concordantemente entre las herramientas especializadas y se restringió a DL38 y DLAM9. Esta detección constituye la principal evidencia genómica concordante de resistencia antimicrobiana en ambas cepas. En contraste, PP28 no presentó detecciones concordantes de genes de resistencia mediante las herramientas especializadas; la única detección asociada a resistencia correspondió a *crp* mediante CARD, anotado como regulador global vinculado indirectamente con la expresión de sistemas de eflujo.

Tabla 9. Genes asociados resistencia antimicrobiana o funciones relacionadas detectados en cepas seleccionadas.

Cepa	Gen detectado	Herramienta/base de datos	Cobertura (%)	Identidad (%)	Producto o función reportada	Categoría funcional
DL38	<i>bla_{PFM-3}</i>	ABRicate/NCBI AMR; ABRicate/CARD; AMRFinderPlus	100,00	100,00	Metalo β-lactamasa PFM-3, subclase B2	β-lactamasa
DL38	<i>mexF</i>	ABRicate/CARD	98,71	84,09	Componente del sistema de eflujo MexEF-OprN	Eflujo multidroga
DL38	<i>mexQ</i>	ABRicate/CARD	98,48	81,87	Componente del sistema de eflujo MexPQ-OpmE	Eflujo multidroga
DL38	<i>yajC</i>	ABRicate/CARD	92,04	82,69	Proteína asociada a fitness bajo exposición antimicrobiana	Respuesta antimicrobiana indirecta
DLAM9	<i>bla_{PFM-3}</i>	ABRicate/NCBI AMR; AMRFinderPlus	100,00	100,00	Metalo β-lactamasa PFM-3, subclase B2	β-lactamasa
DLAM9	<i>mexF</i>	ABRicate/CARD	98,71	84,09	Componente del sistema de eflujo MexEF-OprN	Eflujo multidroga
DLAM9	<i>mexQ</i>	ABRicate/CARD	98,48	81,87	Componente del sistema de eflujo MexPQ-OpmE	Eflujo multidroga
PP28	<i>crp</i>	ABRicate/CARD	100,00	84,20	Regulador global cAMP dependiente asociado a regulación de MdtEF	Regulación transcripcional

Las demás detecciones obtenidas mediante CARD correspondieron a componentes asociados a sistemas de expulsión, respuesta antimicrobiana o regulación transcripcional, por lo que fueron interpretadas como genes relacionados con funciones de respuesta o tolerancia antimicrobiana.

Posteriormente, se revisaron las proteínas GyrA y ParC para evaluar sustituciones aminoacídicas en las regiones QRDR asociadas a resistencia a fluoroquinolonas. Esta revisión no evidenció sustituciones clásicas en las posiciones evaluadas. En DL38 y DLAM9 se conservaron las posiciones críticas equivalentes de GyrA y ParC. En PP28, GyrA conservó Ser83 y Asp87, mientras que ParC conservó los residuos equivalentes a Ser80 y Glu84.

Finalmente, se revisaron las anotaciones de Prokka para identificar genes candidatos relacionados con dianas de CIP, transporte multidroga, regulación y permeabilidad de membrana externa. Los genes identificados se organizaron por categoría funcional y cepa (Tabla 10). En conjunto, las cepas evaluadas presentaron genes asociados a dianas de CIP y a funciones generales de transporte, regulación y permeabilidad; sin embargo, no se detectaron genes clásicos de resistencia a quinolonas ni sustituciones QRDR clásicas en las posiciones evaluadas.

Tabla 10. Genes candidatos asociados a dianas de CIP, sistemas de expulsión multidroga y permeabilidad de membrana externa anotados mediante Prokka.

Categoría	DL38	DLAM9	PP28
Dianas de CIP	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>	<i>gyrA, gyrB, parC, parE</i>
Sistemas de eflujo multidroga principales	<i>mexA, mexB, ttgA, ttgB, ttgC, ttgF, ttgI, mdtA, mdtB, mdtC, oprM, tolC</i>	<i>mexA, mexB, acrF, ttgA, ttgB, ttgC, ttgF, ttgI, mdtA, mdtB, oprM, tolC</i>	<i>acrR, acrA, acrB, tolC, baeR, baeS, mdtA, mdtB, mdtC, mdtD</i>
Otros transportadores multidroga	<i>macA, macB, emrA, emrB, norM, mdtK, mdtG, mdtJ, mdtL</i>	<i>macA, macB, emrA, emrB, norM, mdtK, mdtG, mdtJ, mdtL</i>	<i>mdfA, emrA, emrB, emrE, mdtK, mdtH, mdtM, macA, macB</i>
Reguladores asociados	<i>ompR, rpoS</i>	<i>ompR, rpoS</i>	<i>crp, acrR, baeR, baeS, soxS, rob, rpoS, ompR</i>
Permeabilidad/membrana externa	<i>oprF, oprD, oprB, oprM, tolC, nicP</i>	<i>oprF, oprD, oprB, oprM, tolC, nicP</i>	<i>tolC, ompA, ompX, ompC, ompD, ompL, lamB, kdgM</i>

En conjunto, los análisis genómicos mostraron que DL38, DLAM9 y PP28 conservan las dianas moleculares de CIP, y presentan genes relacionados con transporte multidrogas, regulación y permeabilidad de membrana externa. Sin embargo, no se detectaron genes

clásicos de resistencia a quinolonas ni sustituciones QRDR clásicas en las posiciones evaluadas. El gen *bla*_{PFM-3} fue detectado únicamente en DL38 y DLAM9, mientras que PP28 presentó solo una detección mediante CARD correspondiente a *crp*, interpretada como un regulador global asociado indirectamente a resistencia. Estos resultados establecen el marco genómico para interpretar las diferencias fenotípicas observadas frente a CIP, sin demostrar por sí mismos un mecanismo causal de tolerancia o biotransformación.

6 Discusión

6.1 Contexto ambiental y recuperación de bacterias cultivables

Los sitios incluidos en este estudio corresponden a bahías subantárticas caracterizadas por condiciones ambientales frías, sedimentos de pH levemente alcalino y bajo contenido de materia orgánica. Estas características permiten situar el estudio en un contexto marino costero donde el metabolismo y la estructura de las comunidades microbianas pueden estar condicionados por la temperatura, la disponibilidad de carbono y la matriz sedimentaria. En ambientes fríos, las bajas temperaturas reducen la velocidad de las reacciones enzimáticas, afectan la fluidez de la membrana celular y limitan la eficiencia de procesos celulares esenciales. Asimismo, la disponibilidad y calidad del carbono orgánico constituyen factores relevantes para sostener la actividad heterotrófica y el funcionamiento de las comunidades microbianas en estos ecosistemas (Cary et al., 2010; Cavicchioli et al., 2019; Collins and Margesin, 2019; Ramón et al., 2023; Purwar & Srivastava, 2024). En ambos sitios se observaron residuos sólidos acumulados o

dispersos en la zona de varamiento, lo que constituye un antecedente cualitativo de intervención antrópica local. Sin embargo, debido a que no se realizaron mediciones químicas de CIP ni de otros contaminantes farmacológicos en agua o sedimento, estos antecedentes deben interpretarse como evidencia contextual de intervención humana y no como demostración directa de exposición ambiental a antibióticos.

A partir de estas matrices se recuperó un conjunto de bacterias cultivables compuesto por aislados provenientes de agua de mar y sedimento. Este aislamiento se realizó utilizando un agar cromogénico formulado para la detección selectiva de *E. coli* y otros coliformes en muestras de agua y alimentos. De acuerdo con el fabricante, este medio contiene peptona, sorbitol y piruvato para favorecer el crecimiento bacteriano, Tergitol-7 como agente inhibidor de bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, y una mezcla cromogénica que permite diferenciar colonias mediante la actividad β -D-galactosidasa y β -D-glucuronidasa. Por lo tanto, la estrategia de aislamiento utilizada favoreció la recuperación de bacterias cultivables capaces de crecer bajo una condición selectiva orientada principalmente a coliformes y bacterias Gram negativas, más que una recuperación amplia de la diversidad bacteriana ambiental.

En concordancia con esta condición de aislamiento, la composición taxonómica estuvo dominada por géneros pertenecientes principalmente a Gammaproteobacteria, con una alta representación de *Pseudomonas*, junto con *Aeromonas*, *Serratia*, *Rahnella*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Lelliottia* y *Oceanisphaera*, además de aislados no clasificados a nivel de género mediante el análisis del gen del ARNr 16S. Este patrón debe interpretarse como

una caracterización funcional de un subconjunto cultivable seleccionado por el medio de aislamiento y por las condiciones experimentales empleadas, y no como una representación de la diversidad total de las comunidades microbianas presentes en las bahías.

6.2 Susceptibilidad antimicrobiana en aislados ambientales

Los aislados recuperados desde bahía DL y PP presentaron perfiles fenotípicos variables de susceptibilidad antimicrobiana (halos de inhibición ≥ 14 mm), con menor susceptibilidad principalmente frente a AMP, CXM y CHL. Dado que el cepario estuvo compuesto por bacterias ambientales pertenecientes a distintos géneros, estos resultados deben interpretarse bajo el criterio operacional utilizado en un estudio definido por halos de inhibición ≤ 14 mm y previamente aplicado en bacterias ambientales antárticas. Por ello, estos resultados no equivalen necesariamente a resistencia clínica, sino que permiten comparar la respuesta fenotípica de los aislados bajo un mismo criterio experimental (Jara et al., 2020).

También se observaron perfiles con múltiples no susceptibilidades en ambos sitios. Esta observación indica que una fracción del cepario fue capaz de crecer frente a más de una clase de antibiótico bajo las condiciones del ensayo. En PP, la proporción de aislados con valores MAR $> 0,2$ fue mayor que en DL, aunque el IRA fue relativamente similar entre ambos sitios. Si bien el índice MAR se ha usado como un indicador extrapolado para indicar exposición a ambientes con presión antimicrobiana, en este caso no puede interpretarse como evidencia directa de contaminación antibiótica, ya que no se midieron concentraciones ambientales de estos compuestos ni se identificaron fuentes específicas

de exposición, pero podría inferir el grado de influencia antropogénica sobre las poblaciones bacterianas. Su valor, por tanto, es principalmente comparativo dentro del grupo de bacterias analizadas (Krumperman, 1983; Osundiya et al., 2013).

La detección molecular mediante PCR convencional no evidenció amplicones del tamaño esperado para ninguno de los genes evaluados, que incluyeron determinantes de resistencia asociados a quinolonas, sistemas de expulsión multidroga, sulfonamidas, β -lactámicos, aminoglucósidos, fenicoles, tetraciclinas ni tampoco de plataformas genéticas como integrones. Esta ausencia de detección indica que los fenotipos observados no se explican por los genes específicos incluidos en el estudio. En consecuencia, la discordancia entre el fenotipo y la PCR debe entenderse como una limitación del alcance molecular evaluado, no como ausencia absoluta de mecanismos asociados a resistencia.

6.3 Tolerancia a ciprofloxacino (CIP) y disponibilidad de carbono

La evaluación de CMI permitió identificar un subconjunto de aislados capaces de crecer en presencia de CIP. De los 67 aislados evaluados, solo 14 presentaron crecimiento en al menos una de las concentraciones ensayadas, con valores entre 0,125 y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Este resultado indica que la capacidad de tolerar CIP no fue una característica general del grupo de cepas estudiadas, sino una propiedad restringida a una fracción de los aislados recuperados. Considerando la estabilidad química de las fluoroquinolonas y su baja biodegradabilidad relativa en sistemas ambientales, esta respuesta heterogénea resulta esperable: el crecimiento frente a CIP depende tanto de la susceptibilidad propia

de cada cepa como de su estado fisiológico y del medio en que se realiza el ensayo (Girardi et al., 2011; Kümmerer, 2009; Reis et al., 2020).

Al realizar la evaluación en medio mínimo M9, la tolerancia observada de las cepas en agar MH no se mantuvo. De los 67 aislados evaluados, solo 10 crecieron en presencia de CIP cuando el medio fue suplementado con una fuente adicional de carbono. Todas las cepas crecieron en acetato de sodio + CIP, mientras que 7 también los hicieron en glucosa + CIP. En cambio, no se observó crecimiento detectable cuando el CIP fue incorporado como único compuesto orgánico adicional. Estos resultados indican que la respuesta frente al antibiótico dependió del contexto nutricional del cultivo, sin que ello permita atribuir el crecimiento observado a biotransformación del compuesto.

En la condición M9 + CIP + bacteria no se observaron incrementos sostenidos de DO_{600} compatibles con crecimiento detectable, lo que indica que el CIP no actuó como fuente orgánica suficiente para sostener el crecimiento bacteriano bajo las condiciones evaluadas. Por lo tanto, los resultados no apoyan un metabolismo directo de CIP como fuente principal de carbono. Más bien, el patrón observado correspondería una respuesta dependiente de co-sustratos, donde la actividad metabólica sostenida por una fuente de carbono externa podría permitir crecimiento en presencia del antibiótico. Este escenario concuerda con estudios previos que han descrito que la transformación de CIP suele favorecerse en presencia de co-sustratos y ocurre con mayor frecuencia bajo esquemas de co-metabolismo que como resultado de su utilización directa como sustrato único (Cai et al., 2022b; Feng et al., 2021; Liao et al., 2016).

Las curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas reforzaron esta interpretación. En ausencia de CIP, los cultivos suplementados con glucosa o acetato presentaron incrementos tempranos de DO_{600} , mientras que en presencia de CIP el crecimiento fue menor y más tardío. Esto muestra que el antibiótico mantuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento, incluso cuando existía una fuente de carbono disponible. Dentro de este patrón general, PP15B mostró una respuesta diferenciada, con mayor crecimiento relativo en acetato + CIP que en glucosa + CIP, lo que sugiere que la disponibilidad de carbono no solo permitió o limitó el crecimiento, sino que también moduló la magnitud de la respuesta de manera dependiente de la cepa. El consorcio bacteriano, en cambio, no presentó un comportamiento claramente superior al observado en los aislados individuales, por lo que no se evidenció un efecto colectivo marcado bajo las condiciones ensayadas.

En el caso de PP15B se sugiere esta dependencia del contexto nutricional. Este aislado creció en agar MH con CIP y M9 suplementado con acetato de sodio + CIP, pero no en M9 con glucosa + CIP. Esta diferencia puede explicarse parcialmente por la composición de los medios utilizados. El medio MH, está compuesto por infusión de carne, hidrolizado de caseína y almidón, que aporta nutrientes disponibles y puede reducir la demanda biosintética necesaria para sostener su crecimiento bajo estrés en este caso del CIP. Mientras que en el medio M9, el crecimiento depende de la utilización de una fuente de carbono definida, por lo que el acetato de sodio y la glucosa no necesariamente generan estados fisiológicos equivalentes.

Una explicación posible es que, en presencia de glucosa, haya entrado en un estado de crecimiento más activo, con mayor demanda biosintética y replicativa. Esta condición podría aumentar la susceptibilidad frente a CIP, ya que actúa sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV que están involucradas en la replicación y segregación del ADN (Fàbrega et al., 2009). Un estudio describió en *E. coli* que la susceptibilidad a CIP dependió de la tasa de crecimiento previa al tratamiento: los cultivos con glucosa, mayor tasa de crecimiento, fueron más afectados por CIP que los cultivos en acetato, con menor crecimiento, mostrando una mayor supervivencia (Smirnova and Oktyabrsky, 2018). Aunque este antecedente corresponde a *E. coli*, entrega una base fisiológica para interpretar que el estado de crecimiento inducido por la fuente de carbono puede modificar la respuesta frente a CIP.

Por otra parte, el acetato pudo haber generado en PP15B una condición metabólica que le permite el crecimiento en exposición a CIP. A diferencia de la glucosa, cuyo metabolismo en *Pseudomonas* puede involucrar una red integrada por vías como Entner Doudoroff, pentosas fosfato y componentes de Embden Meyerhof parnas (Nikel et al., 2015), mientras que el acetato ingresa como acetil CoA y se vincula con rutas como el ciclo del glioxilato, que permiten conservar carbono durante el crecimiento y se produce un crecimiento más lento (Meylan et al., 2017). Así, el crecimiento de PP15B en acetato + CIP, pero no en glucosa + CIP, sugiere que la tolerancia observada dependió del estado fisiológico inducido por la fuente de carbono disponible.

En conjunto, estos resultados respaldan parcialmente la hipótesis en su componente de tolerancia a CIP y dependencia de la disponibilidad de carbono. Los aislados no mostraron una capacidad generalizada para crecer frente a CIP, ni utilizaron el antibiótico como fuente de carbono. Sin embargo, las cepas capaces de crecer en presencia de CIP con una fuente de carbono adicional permiten plantear que la tolerancia al antibiótico estuvo asociada al contexto metabólico del cultivo, pero todavía no permite concluir que dicha respuesta haya implicado biotransformación parcial del compuesto.

6.4 Actividad antimicrobiana residual y evaluación funcional de biotransformación

La actividad antimicrobiana residual se mantuvo detectable en los sobrenadantes de DL38, DLAM9 y del consorcio bacteriano durante los 10 días de incubación, sin una tendencia progresiva de disminución entre el inicio y el final del ensayo. En varios casos, el cambio neto entre el día 10 y el día 0 fue cercano a cero o positivo. Lo que indica que el CIP conservó actividad inhibitoria bajo las condiciones evaluadas.

Este resultado delimita la interpretación de la tolerancia discutida en el bloque anterior. Aunque algunas cepas crecieron en presencia de CIP cuando existía una fuente adicional de carbono, esa respuesta no estuvo acompañada por una pérdida sostenida de actividad antimicrobiana. Por lo tanto, los datos son consistentes con tolerancia dependiente del contexto nutricional, pero no con una biotransformación funcional detectable mediante esta aproximación.

En el caso de PP15B, que fue incubado con una concentración inicial menor de CIP, la baja actividad residual observada se ubicó cerca del límite funcional del bioensayo, por lo que las variaciones entre días no permiten inferir una disminución progresiva atribuible a la incubación bacteriana.

La ausencia de una reducción clara en la actividad residual contrasta con antecedentes que describen que la transformación de CIP puede favorecerse en presencia de co-sustratos y bajo esquemas co-metabólicos (Cai et al., 2022b; Feng et al., 2019; Liao et al., 2016). En este estudio, la disponibilidad de glucosa o acetato permitió el crecimiento de un subconjunto de aislados, pero no se tradujo en una pérdida funcional consistente de la actividad inhibitoria. Así, la hipótesis se respalda en el componente de tolerancia y dependencia de carbono, pero no en la promoción de biotransformación parcial detectable por actividad antimicrobiana residual.

6.5 Caracterización genómica y mecanismos asociados a la respuesta frente a ciprofloxacino (CIP).

La caracterización genómica de DL38, DLAM9 y PP28 permitió refinar la identificación taxonómica de los aislados seleccionados por sus respuestas frente a CIP. La identificación de DL38 y DLAM9 como *P. fluorescens* es relevante porque este grupo incluye bacterias ampliamente distribuidas y metabólicamente versátiles, pero también porque sus perfiles de susceptibilidad pueden involucrar rasgos intrínsecos, adaptativos o mecanismos no necesariamente capturados por un panel molecular específico. En este sentido, una revisión reciente ha señalado que distintos fenotipos de resistencia descritos en el complejo *P. fluorescens* podrían estar relacionados con propiedades intrínsecas,

mientras que los genes transferibles de resistencia aparecen con baja frecuencia en los genomas disponibles (Silverio et al., 2022).

En relación con CIP, uno de los resultados relevantes fue la ausencia de genes clásicos de resistencia a quinolonas y sustituciones aminoacídicas en QRDR asociadas con resistencia a fluoroquinolonas (Shariati et al., 2022). Tampoco, se detectaron determinantes como *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* u otros genes directamente vinculados a resistencia plasmídica a quinolonas. Así estos resultados indican que la tolerancia observada no se explica por los mecanismos clásicos, más frecuentes, de resistencia a fluoroquinolonas descritos en bacterias Gram negativas.

Las anotaciones genómicas funcionales sí evidenciaron genes relacionados con transporte multidrogas, regulación y permeabilidad de membrana externa. Estos elementos pueden formar parte de respuestas generales frente a compuestos antimicrobianos, especialmente en bacterias ambientales expuestas a condiciones variables. En el complejo *P. fluorescens*, se han descrito bombas de expulsión y otros mecanismos que pueden contribuir a fenotipos de resistencia como cloranfenicol, tetraciclinas o quinolonas; sin embargo, su sola presencia genómica no permite atribuir causalidad al fenotipo observado frente a CIP (Silverio et al., 2022).

La detección de *bla*_{PFM-3} en DL38 y DLAM9 constituye un hallazgo genómico relevante, pero debe separarse de la respuesta frente a CIP. Las enzimas PFM corresponden a una familia de metalo- β -lactamasas de la subclase B2 descritas en especies del complejo *P.*

fluorescens. Poirel et al. informaron variantes de PFM en *Pseudomonas libanensis* y *P. fluorescens*, incluyendo PFM-3, y señalaron que estas especies pueden constituir reservorios de genes tipo *bla*_{PFM}. En ensayos funcionales estas enzimas se asociaron principalmente con menor susceptibilidad a carbapenémicos, particularmente imipenem, mientras que no se explican posibles mecanismos de respuesta frente a fluoroquinolonas (Poirel et al., 2020). Por ello, *bla*_{PFM-3} puede contribuir a interpretar los perfiles de menor susceptibilidad frente a β -lactámicos, observados en DL38 y DLAM9, pero no el crecimiento en presencia de CIP.

PP28 aportó un contraste útil entre tolerancia en medio rico en nutrientes y crecimiento bajo restricción nutricional. Aunque presentó crecimiento en agar MH con CIP, no sostuvo crecimiento en M9 suplementado con glucosa o acetato de sodio. En este caso la genómica no identificó un mecanismo clásico que explique directamente la tolerancia a CIP; más bien, los resultados apuntan a una respuesta multifactorial, influida por el contexto nutricional, el estado fisiológico y mecanismos generales de transporte, regulación y permeabilidad.

7 Conclusiones

Los 67 aislados bacterianos recuperados desde bahías subantárticas, correspondientes a 32 aislados de Dos Lobos y 35 de Puesto Pomar, presentaron respuestas heterogéneas frente a CIP. La capacidad de crecer en presencia de CIP se restringió a un subconjunto de cepas y dependió de las condiciones nutricionales del cultivo, especialmente de la presencia de acetato de sodio como fuente adicional de carbono. La

ausencia de crecimiento en el medio suplementado únicamente con CIP indicó que este antibiótico no constituyó una fuente de carbono suficiente para sostener crecimiento detectable.

La actividad antimicrobiana residual se mantuvo durante el ensayo, sin una disminución temporal consistente atribuible a la incubación bacteriana. Por lo tanto, las cepas estudiadas no mostraron capacidad para degradar CIP bajo las condiciones experimentales evaluadas, y no se obtuvo evidencia funcional que sustentara la ocurrencia de una biotransformación parcial del antibiótico.

En conjunto, los resultados respaldan parcialmente la hipótesis planteada. Los aislados bacterianos fueron capaces de crecer en presencia de CIP bajo condiciones dependientes de una fuente adicional de carbono; sin embargo, no se obtuvo evidencia funcional que demostrara su capacidad para biotransformar el CIP en las condiciones experimentales evaluadas. Desde una perspectiva biotecnológica estos aislados no pueden considerarse candidatos para la biodegradación de CIP, aunque constituyen un recurso biológico de interés para futuras investigaciones orientadas a comprender los mecanismos de tolerancia a fluoroquinolonas, las respuestas fisiológicas dependientes de co-sustratos y estrategias futuras de bioprospección en ambientes marinos fríos.

8 **Bibliografía**

- Aarestrup, F.M., Woolhouse, M.E.J., 2020. Using sewage for surveillance of antimicrobial resistance. *Science* (1979). 367, 630–632. <https://doi.org/10.1126/science.aba3432>
- Aminov, R.I., 2010. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Annex IV of MARPOL 73/78 Regulations for the Prevention of Pollution by Sewage from Ships, n.d.
- Armada de Chile, 2020. Boletín Estadístico Marítimo. Edición 2020. DIRECTEMAR.
- Ashfield, N., Li, J., Bouzas-Monroy, A., Boxall, A.B.A., 2026. Annual Review of Environment and Resources Silent Side Effects: Pharmaceuticals as Contaminants of Emerging Concern 08, 50. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-111523>
- Auta, A., Hadi, M.A., Oga, E., Adewuyi, E.O., Abdu-Aguye, S.N., Adeloye, D., Strickland-Hodge, B., Morgan, D.J., 2019. Global access to antibiotics without prescription in community pharmacies: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection* 78, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.07.001>
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Boxall, A.B.A., 2004. The environmental side effects of medication. *EMBO Rep.* 5, 1110–1116. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400307>

- Braschi, I., Blasioli, S., Fellet, C., Lorenzini, R., Garelli, A., Pori, M., Giacomini, D., 2013. Persistence and degradation of new β -lactam antibiotics in the soil and water environment. *Chemosphere* 93, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016>
- Brooks, S.T., Jabour, J., van den Hoff, J., Bergstrom, D.M., 2019. Our footprint on Antarctica competes with nature for rare ice-free land. *Nat. Sustain.* 2, 185–190. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0237-y>
- Browne, A.J., Chipeta, M.G., Haines-Woodhouse, G., Kumaran, E.P.A., Hamadani, B.H.K., Zaraa, S., Henry, N.J., Deshpande, A., Reiner, R.C., Day, N.P.J., Lopez, A.D., Dunachie, S., Moore, C.E., Stergachis, A., Hay, S.I., Dolecek, C., 2021. Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *Lancet Planet. Health* 5, e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
- Brun, A.A., Ramirez, N., Pizarro, O., Piola, A.R., 2020. The role of the Magellan Strait on the southwest South Atlantic shelf. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 237, 106661. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2020.106661>
- Bueno, I., He, H., Kinsley, A.C., Ziemann, S.J., Degn, L.R., Nault, A.J., Beaudoin, A.L., Singer, R.S., Wammer, K.H., Arnold, W.A., 2023. Biodegradation, photolysis, and sorption of antibiotics in aquatic environments: A scoping review. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165301>
- Bungau, S., Tit, D.M., Behl, T., Aleya, L., Zaha, D.C., 2021. Aspects of excessive antibiotic consumption and environmental influences correlated with the occurrence of

resistance to antimicrobial agents. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.*

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.10.012>

Cai, Y., Yan, Z., Ou, Y., Peng, B., Zhang, L., Shao, J., Lin, Y., Zhang, J., 2022a. Effects of different carbon sources on the removal of ciprofloxacin and pollutants by activated sludge: Mechanism and biodegradation. *J. Environ. Sci. (China)* 111, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.03.037>

Cai, Y., Yan, Z., Ou, Y., Peng, B., Zhang, L., Shao, J., Lin, Y., Zhang, J., 2022b. Effects of different carbon sources on the removal of ciprofloxacin and pollutants by activated sludge: Mechanism and biodegradation. *J. Environ. Sci. (China)* 111, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.03.037>

Carvalho, I.T., Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ. Int.* <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>

Cary, S.C., McDonald, I.R., Barrett, J.E., Cowan, D.A., 2010. On the rocks: The microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro2281>

Cavicchioli, R., Ripple, W.J., Timmis, K.N., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M., Behrenfeld, M.J., Boetius, A., Boyd, P.W., Classen, A.T., Crowther, T.W., Danovaro, R., Foreman, C.M., Huisman, J., Hutchins, D.A., Jansson, J.K., Karl, D.M., Koskella, B., Mark Welch, D.B., Martiny, J.B.H., Moran, M.A., Orphan, V.J., Reay, D.S., Remais, J. V., Rich, V.I., Singh, B.K., Stein, L.Y., Stewart, F.J., Sullivan, M.B., van Oppen, M.J.H., Weaver, S.C., Webb, E.A., Webster, N.S., 2019. Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0222-5>

- Chaturvedi, P., Shukla, P., Giri, B.S., Chowdhary, P., Chandra, R., Gupta, P., Pandey, A., 2021. Prevalence and hazardous impact of pharmaceutical and personal care products and antibiotics in environment: A review on emerging contaminants. *Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110664>
- Clardy, J., Fischbach, M.A., Currie, C.R., 2009. The natural history of antibiotics. *Current Biology.* <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.001>
- Collins, T., Margesin, R., 2019. Psychrophilic lifestyles: mechanisms of adaptation and biotechnological tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09659-5>
- Couto, C.F., Lange, L.C., Amaral, M.C.S., 2019. Occurrence, fate and removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) in water and wastewater treatment plants—A review. *Journal of Water Process Engineering.* <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100927>
- Crofts, T.S., Gasparrini, A.J., Dantas, G., 2017. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>
- Cycoń, M., Mroziak, A., Piotrowska-Seget, Z., 2019. Antibiotics in the soil environment—degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>
- Cytryn, E., Markiewicz, Z., Popowska, M., 2017. Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes Dissemination in Soils. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2_9
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., Vila, J., 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>

- Feng, G., Huang, H., Chen, Y., 2021. Effects of emerging pollutants on the occurrence and transfer of antibiotic resistance genes: A review. *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126602>
- Feng, N.X., Yu, J., Xiang, L., Yu, L.Y., Zhao, H.M., Mo, C.H., Li, Y.W., Cai, Q.Y., Wong, M.H., Li, Q.X., 2019. Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. *Science of the Total Environment* 665, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.322>
- Fleming-Dutra, K.E., Hersh, A.L., Shapiro, D.J., Bartoces, M., Enns, E.A., File, T.M., Finkelstein, J.A., Gerber, J.S., Hyun, D.Y., Linder, J.A., Lynfield, R., Margolis, D.J., May, L.S., Merenstein, D., Metlay, J.P., Newland, J.G., Piccirillo, J.F., Roberts, R.M., Sanchez, G. V., Suda, K.J., Thomas, A., Woo, T.M., Zetts, R.M., Hicks, L.A., 2016. Prevalence of inappropriate antibiotic prescriptions among us ambulatory care visits, 2010-2011. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 315, 1864–1873. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4151>
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., Toussaint, A., 2005. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1235>
- García, J., García-Galán, M.J., Day, J.W., Boopathy, R., White, J.R., Wallace, S., Hunter, R.G., 2020. A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresour. Technol.* 307, 123228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>

- Giger, W., Alder, A.C., Golet, E.M., Kohler, H.-P.E., McArdell, C.S., Molnar, E., Siegrist, H., J-F Suter, M., 2003. Occurrence and Fate of Antibiotics as Trace Contaminants in Wastewaters, Sewage Sludges, and Surface Waters. *ANALYSIS* 485 CHIMIA 57, 485–491.
- Girardi, C., Greve, J., Lamshöft, M., Fetzer, I., Miltner, A., Schäffer, A., Kästner, M., 2011. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. *J. Hazard. Mater.* 198, 22–30.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.10.004>
- Golet, E.M., Alder, A.C., Giger, W., 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley watershed, Switzerland. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3645–3651.
<https://doi.org/10.1021/es0256212>
- González-Alonso, S., Merino, L.M., Esteban, S., López de Alda, M., Barceló, D., Durán, J.J., López-Martínez, J., Aceña, J., Pérez, S., Mastroianni, N., Silva, A., Catalá, M., Valcárcel, Y., 2017. Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environmental Pollution* 229, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>
- Gothwal, R., Shashidhar, T., 2015. Antibiotic Pollution in the Environment: A Review. *Clean (Weinh)*. <https://doi.org/10.1002/clen.201300989>
- Hamid, B., Bashir, Z., Yattoo, A.M., Mohiddin, F., Majeed, N., Bansal, M., Poczai, P., Almalki, W.H., Sayyed, R.Z., Shati, A.A., Alfaifi, M.Y., 2022. Cold-Active Enzymes and Their Potential Industrial Applications—A Review. *Molecules*.
<https://doi.org/10.3390/molecules27185885>

- Hernández, F., Calisto-Ulloa, N., Gómez-Fuentes, C., Gómez, M., Ferrer, J., González-Rocha, G., Bello-Toledo, H., Botero-Coy, A.M., Boix, C., Ibáñez, M., Montory, M., 2019. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *J. Hazard. Mater.* 363, 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.027>
- Hernández, J., González-Acuña, D., 2016. Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 6. <https://doi.org/10.3402/IEE.V6.32112>
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J.V., 2016a. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., Piddock, L.J.V., 2016b. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387, 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hutchings, M., Truman, A., Wilkinson, B., 2019. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Ilabaca-Carrasco, F., Peña-Raddatz, C., Torres-Bustos, C., Hernández-Cea, M., Nourdin-Galindo, G., Saldivia-Flandez, P., Vargas, C., Koch, E., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., Opazo-Capurro, A., 2025. Detection of KPC-producing Enterobacterales species in wastewater samples from the Gran Concepción Metropolitan area, Chile. *Biol. Res.* 58. <https://doi.org/10.1186/s40659-025-00612-7>

- Jara, D., Bello-Toledo, H., Domínguez, M., Cigarroa, C., Fernández, P., Vergara, L., Quezada-Aguiluz, M., Opazo-Capurro, A., Lima, C.A., González-Rocha, G., 2020. Antibiotic resistance in bacterial isolates from freshwater samples in Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Sci. Rep.* 10, 3145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60035-0>
- Ji, J., Li, H., Liu, S., 2025. Current Natural Degradation and Artificial Intervention Removal Techniques for Antibiotics in the Aquatic Environment: A Review. *Applied Sciences (Switzerland)*. <https://doi.org/10.3390/app15095182>
- Jutkina, J., Rutgersson, C., Flach, C.F., Joakim Larsson, D.G., 2016. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. *Science of the Total Environment* 548–549, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.044>
- Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Keto-Timonen, R., Hietala, N., Palonen, E., Hakakorpi, A., Lindström, M., Korkeala, H., 2016. Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic *Yersinia*. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01151>
- Kim, D.W., Cha, C.J., 2021. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp. Mol. Med.* 53, 301–309. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00569-z>

- Kim, S., Aga, D.S., 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* <https://doi.org/10.1080/15287390600975137>
- Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., Goossens, H., Laxminarayan, R., 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>
- Koch, N., Islam, N.F., Sonowal, S., Prasad, R., Sarma, H., 2021a. Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. *Curr. Res. Microb. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- Koch, N., Islam, N.F., Sonowal, S., Prasad, R., Sarma, H., 2021b. Environmental antibiotics and resistance genes as emerging contaminants: Methods of detection and bioremediation. *Curr. Res. Microb. Sci.* 2, 100027. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100027>
- Kovalakova, P., Cizmas, L., McDonald, T.J., Marsalek, B., Feng, M., Sharma, V.K., 2020. Occurrence and toxicity of antibiotics in the aquatic environment: A review. *Chemosphere* 251, 126351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126351>
- Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 165–170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>

- Kuddus, M., Roohi, Bano, N., Sheik, G.B., Joseph, B., Hamid, B., Sindhu, R., Madhavan, A., 2024. Cold-active microbial enzymes and their biotechnological applications. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14467>
- Kumar, A., Patyal, A., Panda, A.K., 2018. Sub-therapeutic use of antibiotics in animal feed and their potential impact on environmental and human health: a comprehensive review. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 6, 15–25. <https://doi.org/10.21088/jafst.2321.1628.6118.3>
- Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. *Chemosphere.* <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.086>
- Leal, R.M.P., Alleoni, L.R.F., Tornisielo, V.L., Regitano, J.B., 2013. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. *Chemosphere* 92, 979–985. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.018>
- Li, B., Zhang, T., 2010. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3468–3473. <https://doi.org/10.1021/es903490h>
- Li, K., Ji, F., Liu, Y., Tong, Z., Xinmin, Zhan, Hu, Z., 2013. Adsorption removal of tetracycline from aqueous solution by anaerobic granular sludge: Equilibrium and kinetic studies. *Water Science and Technology* 67, 1490–1496. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.016>
- Li, Q., Pan, H., Hao, P., Ma, Z., Liang, X., Yang, L., Gao, Y., 2024. Mechanisms underlying the low-temperature adaptation of 17 β -estradiol-degrading bacterial strain *Rhodococcus* sp. RCBS9: insights from physiological and transcriptomic analyses. *Front. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1465627>

- Liao, X., Li, B., Zou, R., Dai, Y., Xie, S., Yuan, B., 2016. Biodegradation of antibiotic ciprofloxacin: pathways, influential factors, and bacterial community structure. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 7911–7918. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6054-1>
- Mackenzie, J.S., Jeggo, M., 2019. The one health approach-why is it so important? *Trop. Med. Infect. Dis.* 4, 5–8. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Manzetti, S., Ghisi, R., 2014. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 79, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005>
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Meylan, S., Porter, C.B.M., Yang, J.H., Belenky, P., Gutierrez, A., Lobritz, M.A., Park, J., Kim, S.H., Moskowitz, S.M., Collins, J.J., 2017. Carbon Sources Tune Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via Tricarboxylic Acid Cycle Control. *Cell Chem. Biol.* 24, 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.015>
- Moore, J.M., Carvajal, J.I., Rouse, G.W., Wilson, N.G., 2018. The Antarctic Circumpolar Current isolates and connects: Structured circumpolarity in the sea star *Glabraster antarctica*. *Ecol. Evol.* 8, 10621–10633. <https://doi.org/10.1002/ece3.4551>
- Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 139–148. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Narayanan, M., Kandasamy, S., Lee, J., Barathi, S., 2023. Microbial degradation and transformation of PPCPs in aquatic environment: A review. *Heliyon* 9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18426>

- Ng, R.S., Chong, C.P., 2012. Surgeons' adherence to guidelines for surgical antimicrobial prophylaxis - A review. *Australasian Medical Journal*.
<https://doi.org/10.4066/AMJ.2012.1312>
- Nikel, P.I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., De Lorenzo, V., 2015. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, embden-meyerhof-parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry* 290, 25920–25932.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.687749>
- Nsenga Kumwimba, M., Meng, F., 2019. Roles of ammonia-oxidizing bacteria in improving metabolism and cometabolism of trace organic chemicals in biological wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.236>
- Osundiya, O., Oladele, R., Oduyebo, O., 2013. Multiple Antibiotic Resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology* 14, 164–168. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v14i3.8>
- Pehrsson, E.C., Tsukayama, P., Patel, S., Mejía-Bautista, M., Sosa-Soto, G., Navarrete, K.M., Calderon, M., Cabrera, L., Hoyos-Arango, W., Bertoli, M.T., Berg, D.E., Gilman, R.H., Dantas, G., 2016. Interconnected microbiomes and resistomes in low-income human habitats. *Nature* 533, 212–216. <https://doi.org/10.1038/nature17672>
- Poirel, L., Palmieri, M., Brilhante, M., Masseron, A., Perreten, V., Nordmann, P., 2020. PFM-Like Enzymes Are a Novel Family of Subclass B2 Metallo--Lactamases from *Pseudomonas synxantha* Belonging to the *Pseudomonas fluorescens* Complex.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- 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 Sci.* 10, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2016.04.002>
- Ramón, A., Esteves, A., Villadóniga, C., Chalar, C., Castro-Sowinski, S., 2023. A general overview of the multifactorial adaptation to cold: biochemical mechanisms and strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01057-4>
- Reis, A.C., Kolvenbach, B.A., Nunes, O.C., Corvini, P.F.X., 2020. Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part II. *N. Biotechnol.* 54, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.08.003>
- Renew, J.E., Huang, C.H., 2004. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1042, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.056>
- Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M.C., Michael, I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic

- resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment* 447, 345–360. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.032>
- Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Chi, H.P., Bush, K., Hooper, D.C., 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* 12, 83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T.U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J.L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K.M.M., Virta, M., Do, T.T., Walsh, F., Manaia, C.M., 2020. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ. Int.* 140, 105733. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- Roh, H., Subramanya, N., Zhao, F., Yu, C.P., Sandt, J., Chu, K.H., 2009. Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. *Chemosphere* 77, 1084–1089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.049>
- Shariati, A., Arshadi, M., Khosrojerdi, M.A., Abedinzadeh, M., Ganjalishahi, M., Maleki, A., Heidary, M., Khoshnood, S., 2022. The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Front. Public Health* 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633>
- Silverio, M.P., Kraychete, G.B., Rosado, A.S., Bonelli, R.R., 2022. *Pseudomonas fluorescens* Complex and Its Intrinsic, Adaptive, and Acquired Antimicrobial

Resistance Mechanisms in Pristine and Human-Impacted Sites. Antibiotics.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics11080985>

Smirnova, G. V., Oktyabrsky, O.N., 2018. Relationship between *Escherichia coli* growth rate and bacterial susceptibility to ciprofloxacin. FEMS Microbiol. Lett. 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx254>

Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N., Wuertz, S., 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. Nat. Rev. Microbiol. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>

Stanton, I.C., Murray, A.K., Zhang, L., Snape, J., Gaze, W.H., 2020. Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. Commun. Biol. 3, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01176-w>

Tang, X., Lou, C., Wang, S., Lu, Y., Liu, M., Hashmi, M.Z., Liang, X., Li, Z., Liao, Y., Qin, W., Fan, F., Xu, J., Brookes, P.C., 2015. Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China. Soil Biol. Biochem. 90, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.027>

Terauds, A., Chown, S.L., Morgan, F., Peat, H.J., Watts, D.J., Keys, H., Convey, P., Bergstrom, D.M., 2012. Conservation biogeography of the Antarctic. Divers. Distrib. 18, 726–741. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2012.00925.x>

Thiele-Bruhn, S., Peters / Landbauforschung, D., 2007. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces.

- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es0003021>
- Uluşeker, C., Kaster, K.M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., Pala-Ozkok, I., 2021. A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.717809>
- UNEP, 2023. Bracing for superbugs: strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance. United Nations Environment Programme.
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277–283.
- Vicente-Cera, I., Moreno-Andrés, J., Amaya-Vías, D., Biel-Maeso, M., Pintado-Herrera, M.G., Lara-Martín, P.A., Acevedo-Merino, A., López-Ramírez, J.A., Nebot, E., 2019. Chemical and microbiological characterization of cruise vessel wastewater discharges under repair conditions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.008>
- Walters, E., McClellan, K., Halden, R.U., 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water Res.* 44, 6011–6020. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.051>
- Weinstein, M.P., 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute.

- White, A., Hughes, J.M., 2019. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *Ecohealth* 16, 404–409. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>
- Yan, R., Wang, Yibing, Li, J., Wang, X., Wang, Yunkun, 2021. Determination of the lower limits of antibiotic biodegradation and the fate of antibiotic resistant genes in activated sludge: Both nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria matter. *J. Hazard. Mater.* 127764. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127764>
- Yu, Y., Han, P., Zhou, L.J., Li, Z., Wagner, M., Men, Y., 2018. Ammonia Monooxygenase-Mediated Cometabolic Biotransformation and Hydroxylamine-Mediated Abiotic Transformation of Micropollutants in an AOB/NOB Coculture. *Environ. Sci. Technol.* 52, 9196–9205. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02801>
- Zagal, S.Y., 2007. SUELOS Y LODOS Universidad de Concepción Facultad de Agronomía Chillán . Elaborado con la participación de la Comisión de Normalización y Acreditación de la Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo por encargo del Servicio Agrícola y Ganadero . Ciencia Del Suelo.
- Zhang, Y., Gross, C.A., 2021. Cold Shock Response in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 55, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071819-031654>
- Zhao, Q., Guo, W., Luo, H., Xing, C., Wang, H., Liu, B., Si, Q., Ren, N., 2021. Deciphering the transfers of antibiotic resistance genes under antibiotic exposure conditions: Driven by functional modules and bacterial community. *Water Res.* 205. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117672>

Zhu, L., Lin, X., Di, Z., Cheng, F., Xu, J., 2024. Occurrence, Risks, and Removal Methods of Antibiotics in Urban Wastewater Treatment Systems: A Review. Water (Switzerland). <https://doi.org/10.3390/w16233428>

9 Anexo 1

Tabla A. Listado de genes y partidores evaluados mediante PCR.

Gen	Descripción	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Tamaño amplicon	T° alineamiento (°C)	Referencia
16S rRNA	27F-1942R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	TACGGYTACCTTGTACGACTT	1465	57	Pollock J <i>et al.</i> , 2018
qnrA	Gen de resistencia a quinolonas A	GCCCGCTTCTACAATCAAGT	GGCAGCACTATTACTCCCAAG	347	60	Hamed S <i>et al.</i> 2018
qnrB	Gen de resistencia a quinolonas B	TATGGCTCTGGCACTCGTT	GCATCTTCAGCATCGCAC	193	60	Hamed S <i>et al.</i> 2018
qnrS	Gen de resistencia a quinolonas S	TCGGCACCACAACCTTTTCAC	TCACACGCACGGAACCTCTAT	255	60	Hamed S <i>et al.</i> 2018
oqxA	Gen de bomba de eflujo multidroga OqxAB (subunidad A)	CTCTCCTTTCTGCTCGTCGG	AATAGGGGGCGGTCACTTTGG	489	67	Hamed S <i>et al.</i> 2018
oqxB	Gen de bomba de eflujo multidroga OqxAB (subunidad B)	TAGTGCTGGTGGTCTGGTA	GGGTAGGGAGGTCTTTCTTCG	480	68	Hamed S <i>et al.</i> 2018
int1	Gen integrasa de integrón clase 1	CTTTAGGCTAGGAACGGG	CTGCTACTAAATGTGGGTACA	484	54	Himen <i>et al.</i> 2013
int2	Gen integrasa de integrón clase 2	GCAAAATGAAGTGCAACGC	ACACGCTTGCTAACGATG	467	52	Goldstein <i>et al.</i> 2001
sul1	Gen de resistencia a sulfonamidas	GTATTGCGCGCTCTTAGAC	CCGACTTCAGCTTTTGAAGG	408	57	Jara <i>et al.</i> 2020
blaTEM	Gen de beta-lactamasa TEM	TTATCCGCCTCCATCCAGTC	TGGGTGCACGAGTGGGTTAC	526	59	Jara <i>et al.</i> 2020
blaSHV	Gen de beta-lactamasa SHV	CTGGGGAACGGAACGAAATG	GGGTATCCCGCAGATAAAT	389	58	Jara <i>et al.</i> 2020
blaAMP-C	Gen de beta-lactamasa cromosomal (tipo AmpC)	ATTCGTATGCTGGATCTGCCACC	GCTTTACCGTCACGATAGCC	396	55	Jara <i>et al.</i> 2020
blaCTX-M (grupos 1 y 2)	Gen de beta-lactamasa CTX-M (grupos 1 y 2)	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	AGCTTATTCATCGCCAGTT	59	55	Jara <i>et al.</i> 2020
blaIMP	Gen de metalo-beta-lactamasa IMP	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	GTATGTTTCAAGAGTGATGC	587	58	Pitout <i>et al.</i> , 2005
aac(6')-Ib	Gen de acetiltransferasa de aminoglucósidos aac(6')-Ib	CTTGCGATGCTCTATGAGTGG	GAATGCCTGGCGTGTTTGAA	60	480	Hamed S <i>et al.</i> 2018
floR	Gen de resistencia a florfenicol/cloranfenicol	AATCACGGGCCACGCTGTATC	CGCCGTCATTCTTACCT	57	215	Jara <i>et al.</i> 2020
tetA	Gen de resistencia a tetraciclinas (bomba de eflujo TetA)	GCTACATCCTGCTTGCTTTC	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	57	210	Liu <i>et al.</i> 2018
tetX	Gen de resistencia a tetraciclinas (monooxigenasa TetX)	CAATAATGGTGGACCC	TTCTTACCTTGGACATCCCG	278	54	Liu <i>et al.</i> 2018