



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

Explorando el resistoma natural de suelos de la Península Antártica con distintos grados de intervención humanana.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Ingeniero en Biotecnología Molecular**.

José Ignacio Costa

Director y Co-Directora del Seminario de Título:

Dr. Andrés Marcoleta Caldera.

Dra. Rosalba Lagos Mónaco.

Diciembre 2019
Santiago – Chile

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr. José Ignacio Costa.

Evaluación del impacto de la actividad humana sobre la presencia de factores de resistencia a antibióticos en bacterias del suelo antártico.

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Directores Seminario de Título:

Dr. Andrés Marcoleta C.

Dra. Rosalba Lagos M.

Comisión revisadora y evaluadora:

Presidente comisión

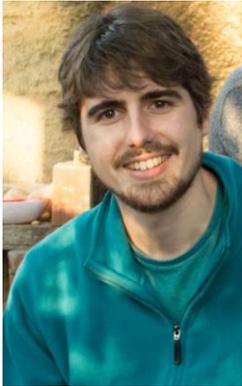
Dr. Marcelo Baeza C.

Evaluador

Dr. Francisco Chavez E.

Santiago de Chile, 16 de diciembre de 2019

BIOGRAFÍA



Nací el 29 de diciembre de 1995 en Buenos Aires, Argentina, donde pasé mis primeros 6 años de vida. A la edad mencionada me trasladé junto a mi familia a Santiago de Chile, lugar donde inicié mis estudios escolares en el Colegio San Juan Evangelista. Es aquí donde hice mis primeros amigos y surqué mis siguientes 12 años de vida. En todo este periodo siempre estuve ligado a la ciencia, especialmente a la biología, eligiendo los electivos relacionados. Aún recuerdo la primera vez que entré al laboratorio de mi colegio, con solo 11 años supe que allí era donde quería estar. Alrededor de un año antes de egresar del colegio descubrí la carrera en una feria científica, en la cual me decidí por la biotecnología, entrando años después a estudiar dicha carrera en la Universidad de Chile. Mi paso por la carrera está lleno de recuerdos y buenos momentos, que hicieron el camino por la dura carrera que elegí una experiencia mucho más llevadera. Hoy me encuentro a puertas de mi titulación, sin saber muy bien que venga después, pero expectante de lo que el futuro me depare.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sobre el problema de la resistencia a los antibióticos	1
1.2 El origen de la resistencia a los antibióticos	2
1.3 Bioprospección de recursos microbianos	3
1.4 El continente antártico y sus ventajas para la bioprospección	4
1.5 El resistoma de <i>Pseudomonas</i>	5
1.5.1 Permeabilidad de membrana restringida.	5
1.5.2 Sistemas de eflujo.....	7
1.5.3 Enzimas de inactivación de antibióticos.	8
1.5.4 Resistencia adquirida.....	9
1.6 Las familias de antibióticos	10
1.6.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular.....	10
1.6.2 Disruptores de membrana.....	13
1.6.3 Inhibidores de la síntesis de proteínas.	13
1.6.4 Inhibidores de DNA topoisomerasas.	16
1.6.5 Inhibidores de la síntesis de ácido fólico.	17
1.7 Secuenciación masiva.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo general:	20
2.2 Objetivos específicos:	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Cepas bacterianas utilizadas	21
3.2 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.....	22
3.3 Genotipificación de bacterias antárticas	23
3.4 Extracción de DNA genómico para secuenciación masiva	24
3.5 Preparación de la librería y secuenciación con MinION	25
3.6 Ensamblaje y anotación del Genoma de <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b	26
3.7 Análisis bioinformático del perfil de resistencia a antimicrobianos	26
3.8 Análisis de perfiles ocultos de Markov (HMMs)	27
3.9 Análisis estadísticos.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Resistencia a antibióticos en bacterias aisladas desde distintas zonas del continente antártico.....	28
4.2 Identificación y clasificación taxonómica de los aislados antárticos más relevantes ..	34
4.3 Secuenciación y análisis genómico del aislado <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b	35
4.4 Identificación de genes asociados a resistencia a antibióticos.....	40
4.5 Identificación de posibles nuevos genes de resistencia a antibióticos en <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b.....	43
5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES	45
6. SÍNTESIS Y CONCLUSIONES	56
7. FINANCIAMIENTO	58
8. REFERENCIAS	59
9. ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de las distintas conformaciones de OprF	6
Figura 2: Captura de una simulación computacional del sistema de eflujo MexAB-OprM de <i>P. aeruginosa</i>	8
Figura 3: Esquema de las etapas de la síntesis de peptidoglicano donde intervienen los antibióticos	11
Figura 4: Estructura química base de los betalactámicos	12
Figura 5: Esquemas de la estructura del ribosoma bacteriano	14
Figura 6: Estructura química de la eritromicina	15
Figura 7: Estructura química de las quinolonas.....	17
Figura 8: Mapa de la Península Antártica.....	21
Figura 9: Total de aislados resistentes para cada antibiótico probado	28
Figura 10: Cantidad de aislados multirresistentes clasificados según su procedencia humanizada o prístina.....	32
Figura 11: Comparación del número de resistencias promedio entre aislados provenientes de zonas prístinas y humanizadas.....	33
Figura 12: Comparación del porcentaje de aislados con resistencia a múltiples antibióticos en cada zona muestreada.....	34
Figura 13: Mapa cromosómico del aislado antártico multirresistente <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b	38
Figura 14: Categorización funcional del proteoma de <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b en distintos subsistemas	39
Figura 15: Propiedades de resistencia antimicrobiana del aislado antártico <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b y de otras cepas de este género	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cepas analizadas por cada zona muestreada.....	22
Tabla 2: Comparación del porcentaje de aislados resistentes entre zonas humanizadas y prístinas.....	29
Tabla 3: Comparación de los índices de resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos procedentes de zonas con o sin intervención humana.....	30
Tabla 4: Taxonomía de las aisladas de mayor multirresistencia	35
Tabla 5: Principales características del genoma de <i>Pseudomonas</i> spp. YeP6b.....	37
Tabla 6: Conteo total de genes AMR	42
Tabla 7: Resumen de los resultados del análisis de perfiles HMM.....	44
Anexo I: Resumen de las familias de antibióticos.....	63
Anexo II: Antibióticos utilizados en este trabajo junto a una breve descripción de su mecanismo	64
Anexo III: Perfiles HMMs asociados a AMR identificados en la cepa YeP6b usando la base de datos Resfams	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AMR	Resistencia a antimicrobianos
PSA	Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	ARN ribosomal
tRNA	RNA de transferencia
mRNA	RNA mensajero
S	Coeficiente de sedimentación
CDS	Regiones codificantes de proteínas
NGS	Secuenciación de nueva generación
pb	Pares de bases
HMM	Modelo oculto de Márkov

CÓDIGO DE ANTIBIÓTICOS

AK	Amikacina	LZD	Linezolid
CIP	Ciprofloxacino	MEM	Meropenem
CPT	Ceftarolina	RD	Rifampicina
CT	Colistina	SXT	Trimetoprima/sulfametoxazol
DA	Clindamicina	TGC	Tigeciclina
E	Eritromicina	TZP	Piperacilina/tazobactam
FEP	Cefepima	VA	Vancomicina
FOT	Fosfomicina/trometamol		

RESUMEN

La creciente ocurrencia de infecciones por bacterias multirresistentes y la inefectividad de los antibióticos disponibles para combatirlas representan uno de los mayores problemas de salud pública actuales. Si bien se ha propuesto que el abuso humano de los antibióticos ha contribuido al desarrollo de esta resistencia, múltiples evidencias apuntan a un origen ancestral de los mecanismos que la subyacen. En este contexto, la bioprospección de ambientes prístinos permite explorar dicho resistoma ancestral como reservorio y sustrato de nuevos mecanismos de resistencia que podrían surgir en el futuro entre cepas clínicas. La Antártica resulta un modelo ideal para este propósito, en donde las condiciones extremas y el aislamiento geográfico han permitido la evolución de microorganismos con capacidades metabólicas y rasgos fenotípicos únicos, y donde además es posible encontrar sitios remotos con escasa o nula intervención humana.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad a distintos antibióticos de bacterias aisladas desde suelo antártico, comparando la prevalencia de bacterias resistentes en muestras obtenidas desde zonas no intervenidas, con aquella registrada en zonas fuertemente intervenidas por el hombre. Se observaron índices sobre 50% de resistencia para algunos de los antibióticos probados en ambos tipos de zonas, y un porcentaje considerablemente mayor de aislados multirresistentes provenientes de zonas no intervenidas, principalmente pertenecientes al género *Pseudomonas*. Entre estos últimos, se identificó el aislado Yep6b resistentes a al menos 10 familias de antibióticos. La secuenciación y el análisis del genoma de esta cepa reveló la

presencia de un bajo número de genes conocidos de resistencia, sugiriendo fuertemente la existencia de nuevos mecanismos que expliquen el fenotipo multirresistente, los cuales se encuentran actualmente en estudio. Nuestros resultados indican que existe una cantidad de genes y mecanismos de resistencia a distintos antibióticos en ambientes naturales y remotos como la Antártica, cuya prevalencia no aumentaría como producto de la intervención humana.

ABSTRACT

The increasing infections by multiresistant bacteria and the ineffectiveness of the antibiotics available to combat them currently represents one of the greatest public health problems. Although it has been proposed that the human abuse of antibiotics has contributed to the development of this resistance, multiple evidences point to an ancestral origin of the mechanisms that underlie it. In this context, the bioprospecting of pristine environments allows exploring this ancestral resistome as a reservoir and substrate of new resistance mechanisms that could arise in the future among clinical strains. Antarctica is an ideal model for this purpose, where extreme conditions and geographic isolation have allowed the evolution of microorganisms with metabolic abilities and unique phenotypic features, and where it is also possible to find remote sites with little or no human intervention.

In this work, the sensitivity to different antibiotics of bacteria isolated from Antarctic soil was evaluated, comparing the prevalence of resistant bacteria in samples obtained from non-intervened areas with that recorded in areas heavily intervened by man. Resistance rates over 50% were observed for some of the antibiotics tested in both types of areas, and a considerably higher percentage of multiresistant isolates from non-intervened areas, mainly belonging to the genus *Pseudomonas*. Among these ones, the Yep6b isolate resistant to at least 10 antibiotic families was identified. The sequencing and genome analysis of this strain revealed the presence of a low number of known resistance genes, strongly suggesting the existence of new mechanisms that explain the multi-resistant phenotype, which are currently under study. Our results

indicate that there are several genes and mechanisms of resistance to different antibiotics in natural and remote environments such as Antarctica, whose prevalence would not increase as a result of human intervention.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sobre el problema de la resistencia a los antibióticos

Los antibióticos han sido durante décadas una herramienta crucial en la medicina moderna, sirviendo no sólo para tratar enfermedades infecciosas sino también como soporte de procedimientos más complejos como cirugías y trasplantes. Sin embargo, a lo largo de los años se ha hecho un uso indiscriminado de esta herramienta terapéutica, llegando a puntos en donde el 50% de los antibióticos prescritos se consideran innecesarios (CDC, 2013). Este fenómeno ha generado una alta presión selectiva en las bacterias lo cual ha contribuido al desarrollo de resistencia (Laxminarayan et al., 2016).

En los últimos años la efectividad de los antibióticos ha disminuido rápidamente, principalmente debido a la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (Laxminarayan et al., 2013). Si a esto le sumamos que, a causa de los costes asociados, las grandes compañías farmacéuticas han abandonado la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos (Panasevich, 2004) podemos entender cómo el asunto ha evolucionado hasta el punto de ser considerado uno de los mayores problemas de salud pública actuales. (Smith et al., 2015).

Como señala el centro de control y prevención de enfermedades de Estados Unidos (CDC, 2013), para combatir el problema se requiere un entendimiento de los principios biológicos que llevan a la evolución, divergencia y diseminación de los genes de resistencia. Por ello, el entender el origen de estos mecanismos y su ocurrencia en ambientes naturales puede aportarnos pistas importantes para el desarrollo de nuevos

antimicrobianos, y para anticiparnos a posibles nuevos mecanismos de resistencia que puedan surgir en el futuro entre bacterias de relevancia clínica.

1.2 El origen de la resistencia a los antibióticos

En este punto surge un debate altamente relevante: ¿ha contribuido el uso masivo de antibióticos a generar *de novo* estos mecanismos de resistencia, a través de mutación espontánea y selección natural?, ¿o los genes de resistencia ya se encontraban previamente en la naturaleza antes de la masificación de los antibióticos y su uso sólo ha contribuido a favorecer el traspaso de estos genes desde bacterias ambientales hacia cepas clínicas, junto con su diseminación y masificación? Para responder a estas preguntas es necesario entender el contexto en el que habitan naturalmente los microorganismos. En el ambiente existe un sinnúmero de especies diferentes conviviendo en constante competencia. En este escenario es evidente la razón por la cual la capacidad de producir agentes antimicrobianos confiere una gran ventaja, y es por ello por lo que se ha seleccionado positivamente, siendo común encontrar una alta presencia de sustancias antimicrobianas en el ambiente (D'Costa et al., 2006). Sin embargo, la evolución funciona para ambos lados. De esta forma, gracias a un proceso de coevolución entre especies con actividad antimicrobiana y cepas resistentes surge el resistoma bacteriano. Se entiende por resistoma al conjunto de determinantes genéticos relacionadas con la resistencia a antibióticos. Esto incluye a genes que a través de mutaciones podrían conferir resistencia (proto genes) y genes que no confieren resistencia hasta que cambie su expresión por mutación de elementos reguladores (genes silentes) (Perry et al., 2014).

En resumen, estos mecanismos de resistencia serían usados naturalmente por las bacterias para aumentar sus probabilidades de supervivencia en el ambiente

altamente competitivo y diverso en el que se encuentran, donde existe una alta producción de sustancias antimicrobianas. En tal caso, la respuesta a las preguntas anteriormente planteadas se encuentra en el ambiente. La comparación entre los resistomas encontrados en muestras ambientales de zonas aisladas con poco o nulo contacto con el ser humano y muestras de zonas altamente intervenidas, permitirían dilucidar la influencia de la actividad humana en la presencia de bacterias multirresistentes, junto con explorar el reservorio de posibles genes de resistencia que se encuentran en ambientes naturales de la Península Antártica. Considerando la cercanía y el constante tránsito entre dicha zona de la Antártica y Chile, resulta especialmente relevante conocer el resistoma que se encuentra allí, parte del cual podría ser introducido al mundo humano usando este país como puerta de entrada.

1.3 Bioprospección de recursos microbianos

Se conoce como bioprospección a la búsqueda de nuevos recursos químicos o biológicos en la biodiversidad del ambiente. La bioprospección es una práctica antigua que ha permitido el descubrimiento de numerosos compuestos de valor comercial e importancia industrial. (Beattie et al., 2011). El suelo ha sido durante años una fuente primordial para la bioprospección. Esto gracias principalmente a que soporta una enorme cantidad de biomasa (se estima que contiene un total de $2,6 \times 10^{29}$ células procariontas a lo largo de todo el planeta), albergando gran parte de la diversidad genética de la tierra. (Paul & Clark, 2007). Sin embargo, en los últimos años se ha reducido la probabilidad de aislar nuevos recursos biológicos de dicha fuente, principalmente debido a que en los ambientes habitualmente explorados se encuentran compuestos biológicos similares. Esto ha motivado a la exploración de nuevos e

inusuales hábitats, donde se espera encontrar nuevos metabolitos. (Newman & Cragg, 2016).

1.4 El continente antártico y sus ventajas para la bioprospección

El continente antártico es uno de los ambientes terrestres más extremos. No obstante, se ha demostrado que pese a sus condiciones ambientales adversas alberga una amplia diversidad bacteriana (Tindall, 2004). Si además consideramos el aislamiento geográfico del territorio y por lo tanto el alto endemismo de las especies que allí habitan, la Antártica se posiciona como una zona prometedora para el estudio a nivel microbiológico, y para la obtención de microorganismos con capacidades únicas. Por otra parte, la Antártica cuenta con extensos territorios totalmente prístinos, pero a pesar de su aislamiento, existen bases y asentamientos humanos. Esto permite la comparación de territorios inalterados con otros con intervención humana, lo que para nuestro caso particular puede otorgar indicios sobre la influencia humana en la generación de cepas multirresistentes.

La Península Antártica posee territorios donde el suelo alterna entre un estado congelado (invierno) y descongelado (verano), además de suelos permanentemente congelados (permafrost), ofreciendo condiciones de vida muy variadas. Las zonas descongeladas permiten el crecimiento de microorganismos oportunistas capaces de aprovechar los nutrientes y las mayores temperaturas durante el verano para su rápido crecimiento, mientras que en las zonas permanentemente congeladas se seleccionan microorganismos oligotróficos de lento crecimiento capaces de adaptarse a condiciones de escasos nutrientes, poca disponibilidad de agua y bajas temperaturas (de Pascale et al., 2012). Una característica que comparten los microorganismos que habitan en los polos es la adaptación al frío. Esta incluye cambios en la composición de

membrana, en las enzimas, las cuales deben mantener su actividad a temperaturas alrededor de 0°C y en los compuestos que producen (Casanueva et al., 2010).

1.5 El resistoma de *Pseudomonas*

Estudios previos demostraron que en muestras ambientales antárticas el género *Pseudomonas* predomina, llegando a representar el 41% de las bacterias cultivables (González-Rocha et al., 2017). Otros estudios afirman que en cuanto a la presencia de bacterias multirresistentes en el suelo, el porcentaje de *Pseudomonas* aislados asciende sobre el 50% (Walsh & Duffy, 2013). Al ser el género predominante, se espera que la mayoría de los aislados recuperados a partir de muestras de suelo pertenezcan a este género, por lo que resulta importante entender los mecanismos conocidos de resistencia en *Pseudomonas*, sacando provecho a su ubicuidad en el continente antártico.

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos aeróbicos estrictos. Constituyen el género de bacterias Gram negativas más grande respecto a número de especies. Son naturalmente resistentes a penicilinas y a un gran número de betalactámicos (Gomila et al., 2015). En cuanto a su resistoma, la mayoría de estudios se centran en *P. aeruginosa*, debido a que corresponde a la especie con mayor incidencia clínica, presentando cepas altamente virulentas y una variedad de cepas multiresistentes, pero que en general comparten similares mecanismos de resistencia. Según se describe en la revisión realizada por Pang (2019), son tres los factores que forman su principal barrera de defensa contra antimicrobianos:

1.5.1 Permeabilidad de membrana restringida.

La mayoría de los antibióticos contra *Pseudomonas* necesitan penetrar al espacio intracelular para llevar a cabo su acción. Los betalactámicos y quinolonas

entran a la célula a través de porinas mientras que los aminoglucósidos y polimixinas promueven su propia captación al interactuar con el LPS de la membrana externa de bacterias Gram negativo. La revisión destaca principalmente tres porinas (OprF, OprD y OprH) que restringen la permeabilidad de membrana y están involucradas directamente en fenómenos de resistencia a antimicrobianos. OprF es una porina no específica encargada de la captación de iones y azúcares. Esta es la porina más abundante en la membrana de *Pseudomonas* y es la responsable de su baja permeabilidad. OprF posee dos estados conformacionales distintos. El estado cerrado que consiste en un dominio Barril β transmembrana N-terminal y un dominio globular periplásmico C-terminal; y el estado abierto conformado sólo por el dominio transmembrana (**Figura 1**). La conformación cerrada es la predominante correspondiendo al 95% de la población de canales. Ocasionando una permeabilidad de membrana entre 12 y 100 veces menor que en *E. coli*.

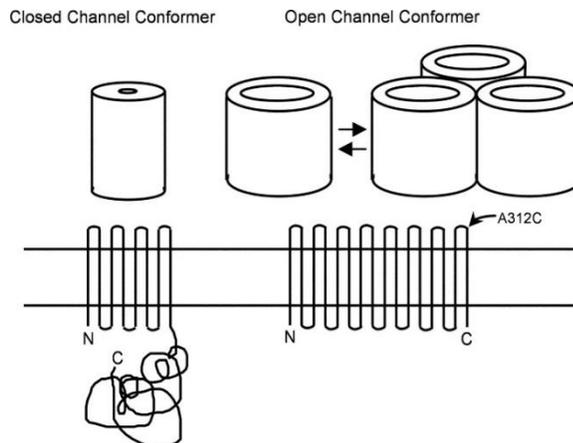


Figura 1: Esquema de las distintas conformaciones de OprF. (Sugawara et al., 2006)

OprD es una porina específica encargada del transporte de aminoácidos básicos. Además, permite el paso de antibióticos betalactámicos y específicamente carbapenémicos, siendo ésta su principal vía de entrada, por lo que su delección

confiere resistencia. Otra de las porinas que restringe la permeabilidad de la membrana externa es OprH, que es gatillada por cambios en el potencial de membrana. Su sobreexpresión, causada por una disminución en los niveles de Mg^{2+} genera resistencia a gentamicina y polimixina B debido a estabilización de la membrana externa por modificación del LPS.

1.5.2 Sistemas de eflujo.

El siguiente factor destacado por Pang (2019) son los sistemas de eflujo bacteriano. Estos expulsan las toxinas fuera de la célula antes de que puedan realizar su efecto y han sido clasificados en cinco familias: la familia RND (resistance-nodulation-division), MFS (major facilitator superfamily), ABC (ATP-binding cassette), SMR (small multidrug resistance), y MATE (multidrug and toxic compound extrusion). De las anteriores, la familia de bombas RND es la principal responsable de conferir resistencia en *P. aeruginosa*. Su estructura básica consiste en proteínas de transporte en la membrana citoplasmática, proteínas “linker” en el periplasma y porinas de membrana externa. Los componentes del citoplasma y periplasma de las bombas RND en *P. aeruginosa* se conocen como Mex (multidrug efflux), se clasifican con una letra y se acompañan con su porina asociada (**Figura 2**). Se conocen 5 bombas RND en *P.aeruginosa* asociadas a resistencia. MexAB-OprM es responsable del flujo de β -lactámicos y quinolonas, MexCD-OprJ bombea β -lactámicos, MexEF-OprN expulsa quinolonas, MexJK-OprM bombea tetraciclina y eritromicina y MexXY-OprM transporta aminoglucósidos (Pang et al., 2019).

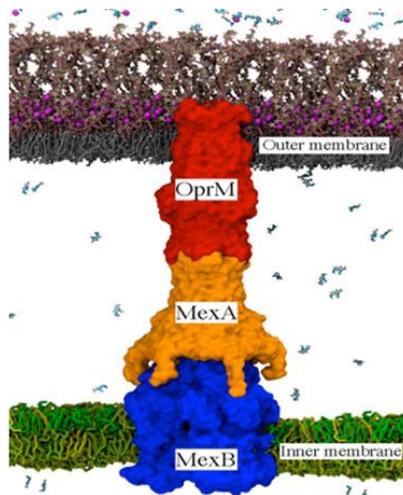


Figura 2: Captura de una simulación computacional del sistema de eflujo MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. Adaptado de (López et al., 2017).

1.5.3 Enzimas de inactivación de antibióticos.

Representa a uno de los mecanismos de resistencia a antibióticos más comunes en bacterias (Pang et al., 2019). Como su nombre lo indica corresponden a enzimas cuyo sustrato son directamente antibióticos específicos. Estas enzimas son capaces de modificar el antibiótico inactivándolo o disminuyendo su actividad. En la revisión se señala que *P. aeruginosa* posee principalmente actividad contra dos familias de antibióticos, betalactámicos y aminoglucósidos.

1.5.3.1 *Betalactamasas.*

Dependiendo de su secuencia, las betalactamasas se clasifican en 4 clases (A, B, C, D). Las betalactamasas de clase A, C, y D hidrolizan el anillo betalactámico al actuar sobre un residuo de serina. Las de tipo B son metaloenzimas que requieren Zn^{2+} para realizar la hidrólisis. El gen *ampC* presente en *P. aeruginosa* codifica para una betalactamasa de clase C. Éstas inhiben cefalosporinas específicas contra *Pseudomonas*. Se han visto algunas cepas que también poseen betalactamasas de espectro extendido (ESBLs), generalmente de clase A o D. Éstas son capaces de lidiar

con la mayoría de los antibióticos betalactámicos incluyendo penicilina, cefalosporinas y aztreonam.

1.5.3.2 *Enzimas de inactivación de Aminoglucósidos.*

Se conocen tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en bacterias: aminoglucósido fosfotransferasa (APH), aminoglucósido acetiltransferasa (AAC) y aminoglucósido nucleotidiltransferasa (ANT), todas ellas presentes en ciertas cepas de *P. aeruginosa* (Pang et al., 2019). Las APHs inactivan kanamicina, estreptomycin y neomicina al actuar sobre su grupo 3'-hidroxilo. Las AACs tienen actividad sobre los grupos amino 3' y 6' de la gentamicina, tobramicina, netilmicina y amikacina. Finalmente, las ANTs actúan tanto en el grupo amino como hidroxilo de los antibióticos gentamicina, tobramicina y amikacina.

1.5.4 Resistencia adquirida.

Se ha visto que *Pseudomonas* puede adquirir resistencia mediante mutaciones que cambian la permeabilidad de membrana, como por ejemplo la delección de la porina OprD que confiere resistencia a imipenem. Mutaciones en blancos de antibióticos, como por ejemplo mutaciones en DNA girasas o topoisomerasas pueden generar resistencia a quinolonas. Mutaciones en reguladores transcripcionales como PhoPQ y PmrAB que lleven a modificaciones en el LPS, específicamente al lípido A, se ha visto que generan resistencia a polimixinas (Pang et al., 2019). *P. aeruginosa* también puede adquirir nuevos genes por medio de la transferencia horizontal. Los genes de resistencia a los antibióticos se pueden movilizar en plásmidos, transposones, integrones y profagos. Las *Pseudomonas* pueden adquirir estos genes a través de conjugación, transformación o transducción desde diferentes especies bacterianas (Pang et al., 2019).

1.6 Las familias de antibióticos

En este trabajo se usaron 15 antibióticos de distintas familias, por lo que es importante revisar brevemente las clases de antibióticos que existen y cómo actúan. A continuación, clasificaremos los antibióticos por mecanismos, centrándonos en los utilizados.

1.6.1 Inhibidores de la síntesis de la pared celular.

La pared celular bacteriana es una capa ubicada sobre el lado exterior de la membrana plasmática que otorga protección a la célula y funciona como mediadora entre ésta y su entorno (Madigan et al., 2013). Está formada principalmente por peptidoglicano, un polímero de azúcar y aminoácidos que se entrelazan formando una malla. Los monómeros del peptidoglicano polimerizan formando cadenas por acción de una enzima transglicosidasa. Posteriormente, estas cadenas se unen por medio del entrecruzamiento de sus aminoácidos laterales guiado por la enzima transpeptidasa, que utiliza como sustrato su grupo acil-D-alanil-D-alanina, lo que resulta en una estructura tridimensional de gran rigidez (Madigan et al., 2013). Ambos procesos son blancos de antibióticos (**Figura 3**).

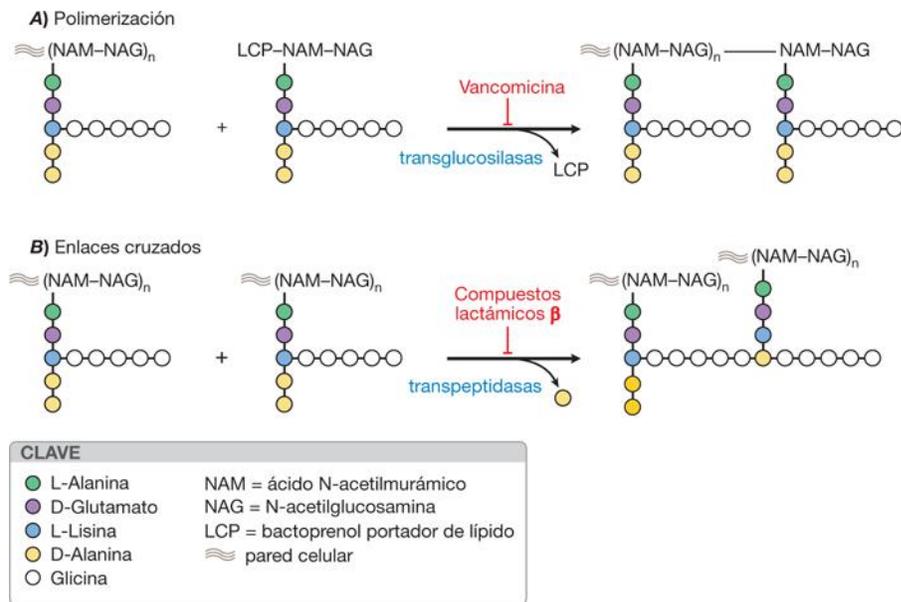


Figura 3: Esquema de las etapas de la síntesis de peptidoglicano donde intervienen los antibióticos (Hilal-Dandan & Brunton, 2015)

a) *Betalactámicos*. Inhiben el proceso de transpeptidación del peptidoglicano, debilitando la pared celular bacteriana y promoviendo la lisis (Kong et al., 2010). Se suelen utilizar junto con inhibidores de betalactamasas como tazobactam, clavulanato y sulbactam (Kong et al., 2010). La familia se subdivide en las siguientes categorías:

- Penicilinas, derivadas del ácido 6-aminopenicilánico, principalmente activas contra bacterias Gram positivo (Kong et al., 2010). Ej: piperacilina combinada con el inhibidor tazobactam (TZP).
- Cefalosporinas, derivados del ácido-7-cefalosporánico, resistentes a betalactamasas. Se agrupan por generaciones (hasta 5) donde cada generación posee una mayor resistencia a betalactamasas (Kong et al., 2010). Ej: 4ª generación: cefepima (FEP), 5ª generación: ceftarolina (CPT).

- Monobactámicos, caracterizados por poseer un anillo betalactámico monocíclico (**Figura 4**), sólo son efectivos contra bacterias aeróbicas Gram negativo (Lindner et al., 2000). Ej: Aztreonam (no utilizado).
- Carbapenémicos, antibióticos betalactámicos de mayor resistencia a betalactamasas. Se caracteriza por poseer un átomo de carbono en la posición 1 del anillo en vez del átomo de azufre que se encuentra en los otros betalactámicos y una insaturación entre el carbono 2 y 3 del anillo pentamérico (**Figura 4**) (Anderson, 2016). Ej: meropenem (MEM).

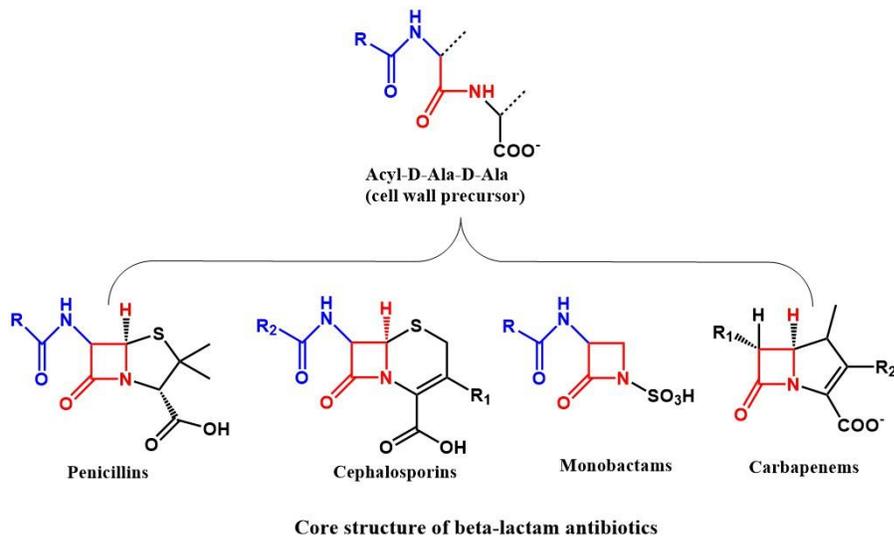


Figura 4: Estructura química base de los betalactámicos. En rojo el anillo betalactámico. (RingBio, s.f.) <https://ringbio.com/es/node/183>.

b) *Glucopéptidos*. Actúan inhibiendo una etapa previa de la síntesis de peptidoglicano en comparación a los betalactámicos. Se unen al grupo acil-D-alanil-D-alanina del peptidoglicano evitando su polimerización. Activos contra bacterias Gram positivo aeróbicas y anaeróbicas. Ej: vancomicina (VA).

1.6.2 Disruptores de membrana.

La membrana citoplasmática es una bicapa lipídica que delimita el espacio intracelular diferenciándolo del medio extracelular. Su integridad resulta indispensable para el correcto funcionamiento de la célula, actuando como una barrera selectiva que regula el intercambio de solutos y moléculas (Madigan et al., 2013). Esta selectividad permite mantener un desequilibrio entre los iones del espacio extra e intracelular generando un potencial de membrana que es aprovechado por la célula. Una abertura en la membrana provocaría la difusión de cargas que podrían culminar en la desestabilización de la bicapa y la posterior lisis celular (Bruce, 2014).

a) *Polipéptidos*. Interaccionan tanto con la membrana externa de bacterias Gram negativo como con la membrana citoplasmática. Actúan como detergentes cambiando la permeabilidad de la membrana y provocando la salida de iones, lo que culmina en la desestabilización de la membrana y la muerte celular. Son compuestos catiónicos, por lo que cambios en la composición de la membrana que provoquen una disminución en su carga aniónica, pueden contribuir a la generación de resistencia (Axelsen, 2008). Ej: colistina (CT).

b) *Lipopéptidos*. Activos contra bacterias Gram positivo. En presencia Ca^{2+} se unen a la membrana citoplasmática provocando una rápida despolarización que lleva a la inhibición de la síntesis de proteínas, de DNA y de RNA. El efecto final es la muerte de la célula bacteriana sin provocar lisis (Canepari & Boaretti, 1996). Ej: daptomicina (no utilizado).

1.6.3 Inhibidores de la síntesis de proteínas.

Las proteínas son los eslabones estructurales y funcionales de la célula. Son sintetizadas por el ribosoma, un complejo ribonucleoproteico formado por una

subunidad menor (30S) conformada por múltiples proteínas y el RNA ribosomal (rRNA) 16S y otra mayor (50S) formada por los rRNA 5S y 23S. Ambas subunidades juntas constituyen al ribosoma 70S (**Figura 5**). El ribosoma posee tres sitios, el sitio A de entrada de nuevos RNA de transferencia (tRNA) cargados, el sitio P de elongación y el sitio E de salida de los tRNA. La síntesis de proteínas se realiza utilizando la información del RNA mensajero (mRNA), y los aminoácidos suministrados por los tRNA para así ensamblar la proteína en crecimiento (**Figura 5**). La mayoría de los antibióticos actúan en las etapas finales de la síntesis de proteínas, interrumpiendo la elongación de la proteína o evitando su liberación, sin embargo, los antibióticos más modernos actúan inhibiendo la etapa de iniciación. De cualquier manera, el interrumpir la síntesis de proteínas irreversiblemente suele culminar en la muerte celular (Madigan et al., 2013).

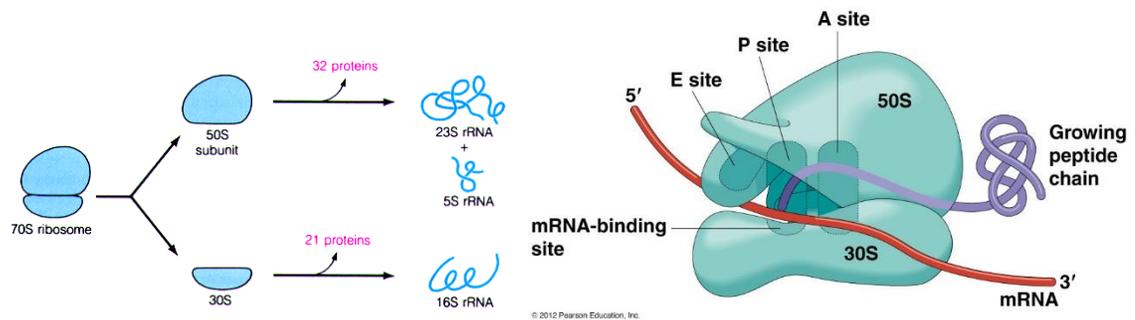


Figura 5: Esquemas de la estructura del ribosoma bacteriano. Derecha, esquema que ejemplifica la composición del ribosoma de *E.coli* (Mathews et al., 1999). Izquierda, esquema del proceso de traducción (Hardin & Bertoni, 2016).

1.6.3.1 Inhibidores de la subunidad ribosomal 30S.

a) *Aminoglucósidos*. Son producidos naturalmente por varias especies de *Streptomyces*. Afectan principalmente a bacterias Gram negativas aeróbicas. Se une a la subunidad ribosomal 30S entorpeciendo el paso del aminoacil-tRNA del sitio A al sitio P, causando errores de lectura del mRNA. Como resultado se originan péptidos

anormales que se acumulan intracelularmente y que eventualmente conducen a la muerte celular (Moore, 2019). Ej: amikacina (AK).

b) *Tetraciclinas*. Evitan la unión del aminoacil-tRNA al ribosoma al bloquear el sitio A de la subunidad 30S (Connell et al., 2003). Ej: tigeciclina (TGC), perteneciente al subgrupo de las glicilciclinas que son derivados modificados de la tetraciclina minociclina.

1.6.3.2 Inhibidores de la subunidad ribosomal 50S.

a) *Oxazolidinonas*. Bloquean la etapa inicial de la síntesis de proteínas. Inhiben la formación del complejo de iniciación 70S. La resistencia se produce por una mutación en el gen 23S rRNA que disminuye la afinidad del antimicrobiano al ribosoma (Pigrau, 2003). Ej: linezolid (LZD).

b) *Macrólidos*. Se caracterizan por poseer un anillo macrocíclico de lactona (**Figura 6**). Son bacteriostáticos, es decir, detienen el crecimiento bacteriano pero no provocan la muerte celular. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en la bacteria al unirse reversiblemente a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Específicamente, interfieren con la actividad peptidiltransferasa deteniendo la traducción (Wang et al., 2017). Ej: eritromicina (E).

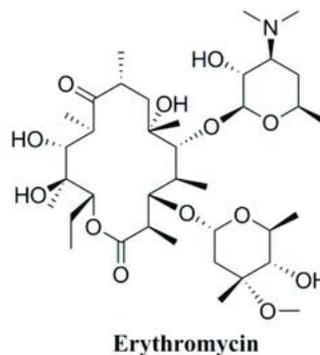


Figura 6: Estructura química de la eritromicina. Adaptado de (Wang et al., 2017).

c) *Lincosamidas*. Bloquean la salida del péptido del ribosoma y causan disociación del peptidil-tRNA del ribosoma (Tenson et al., 2003). Ej: clindamicina (DA).

1.6.4 Inhibidores de DNA topoisomerasas.

El superenrollamiento es el fenómeno por el cual el DNA se enrolla sobre sí mismo permitiendo aumentar su nivel de compactación. El proceso se da como consecuencia de mantener una tensión estructural en la molécula. Las topoisomerasas regulan el superenrollamiento realizando cortes y ligaciones en la molécula de DNA, siendo indispensables para el desenrollamiento del DNA durante la transcripción y replicación. Poseen un dominio nucleasa que realiza cortes de una hebra en la cadena nucleotídica permitiendo la descompactación del DNA y luego recompone el corte con su dominio ligasa. La alteración de su función puede provocar daños irreparables en el DNA que lleven a la muerte celular (Idred et al., 2014). Entre los inhibidores de DNA topoisomerasas más conocidos se encuentran los compuestos sintéticos llamados fluoroquinolonas, cuya primera generación es conocida como quinolonas. Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro y se caracterizan por poseer un grupo fluoruro en su anillo central (**Figura 7**). Son bactericidas y actúan inhibiendo el dominio ligasa de la DNA girasa y topoisomerasa IV. Las fluoroquinolonas bloquean la actividad del dominio ligasa provocando que el DNA se libere con cortes en sus hebras llevando a la muerte celular (Idred et al., 2014). Se ha reportado que alteraciones en la permeabilidad de membrana pueden contribuir a la generación de resistencia contra esta familia de antibióticos (Moore, 2019). Ej: ciprofloxacino (CIP).

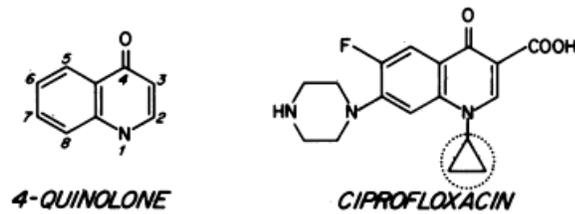


Figura 7: Estructura química de las quinolonas. Derecha, estructura química de 4-quinolona (Quinolona). Izquierda, Estructura química de ciprofloxacino (fluoroquinolona). Adaptado de: (Wolfson & Hooper, 1985).

1.6.5 Inhibidores de la síntesis de ácido fólico.

Entre los inhibidores del ácido fólico más conocidos se encuentran las sulfonamidas, las cuales son análogos del ácido p-aminobenzoico (PABA). Son bacteriostáticos y de amplio espectro. Interfieren con la síntesis de ácido fólico al competir con PABA por el sitio activo de su enzima dihidropteroato sintasa (DHPS). El folato es necesario en la célula para sintetizar ácidos nucleicos, por lo que al inhibir su síntesis la división celular se detiene (Brugueras & García, 1999). Ej: trimetoprima/ sulfametoxazol (SXT).

En el **Anexo I** se encuentra una tabla resumen de las familias de antibióticos descritas anteriormente. Por otra parte, en el **Anexo II**, se adjunta una tabla con los antibióticos utilizados en este trabajo junto con una breve descripción de su mecanismo de acción.

1.7 **Secuenciación masiva**

Debido a la gran información contenida en el DNA, la genómica ha adquirido un papel fundamental en distintas áreas de investigación biológica (Garrigues, 2017). A diferencia de la genética, esta disciplina se caracteriza por el estudio del DNA de manera integral y a gran escala. Sin embargo, su auge no hubiese sido posible sin el desarrollo de las tecnologías de secuenciación masiva (también conocidas como *next*

generation sequencing, NGS), que permiten la secuenciación de miles de millones de bases en un tiempo acotado y a un costo accesible. En este trabajo se utilizaron dos tecnologías NGS: Illumina y Nanopore (MinION).

Illumina es la tecnología de secuenciación más utilizada actualmente. Se caracteriza por generar fragmentos cortos (100-300 pb) de muy alta calidad. La secuenciación transcurre a medida que la cadena de DNA se elonga, técnica conocida como secuenciación por síntesis. Los nucleótidos son marcados con fluoróforos siendo detectados a medida que se incorporan a la cadena. El fluoróforo bloquea la polimerización del siguiente nucleótido por lo que la elongación se detiene hasta que este es eliminado. De esta forma la secuenciación transcurre en ciclos de adición de nucleótidos marcados, detección y eliminación de la marca (Garrigues, 2017). Sin embargo, las lecturas entregadas por Illumina no superan las 300 pb, lo que dificulta el posterior ensamblaje de dichas lecturas en un número reducido de contigs. Por ello, para lograr el ensamblaje completo de genomas microbianos, en los últimos años se han desarrollado métodos de ensamblaje híbridos que permiten combinar las lecturas Illumina con los datos de secuencia obtenidos usando tecnologías capaces de generar lecturas largas (5-20 kpb) como PacBio y Nanopore (MinION).

MinION es un dispositivo de secuenciación portátil desarrollado por la empresa Oxford Nanopore. Permite secuenciar gigabases de datos de lecturas largas a un bajo costo. Su funcionamiento se basa en proteínas insertadas en membranas formando nanoporos de alrededor de 1 nm de diámetro interno, a través de los cuales pueden transitar moléculas de DNA. Los poros poseen unidos ligandos o aptámeros, que permiten reconocer una secuencia adaptadora, y están fusionados a un motor molecular, por ejemplo, una enzima procesiva que facilita el paso del DNA. El

dispositivo emite una corriente iónica a través de los nanoporos, y mide los cambios en el voltaje a medida que la hebra de DNA transita a través del nanoporo. La información sobre el cambio en la corriente se utiliza para identificar las diferentes bases nitrogenadas que componen la molécula, cada una de las cuales tiene asociado un patrón eléctrico distintivo. De esta manera se pueden generar lecturas entre 5 Kpb y 200 Kpb aunque con una mayor tasa de error en comparación con Illumina (Oxford Nanopore Technologies, s.f.).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Explorar el resistoma ambiental de la Península Antártica, a través del estudio de los perfiles de resistencia a antibióticos de aislados bacterianos recuperados desde muestras de suelo del territorio con distintos grados de intervención humana.

2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar la sensibilidad de cepas bacterianas aisladas a partir de suelo antártico a 15 tipos de antibióticos distintos.

2. Determinar la presencia de mecanismos conocidos de resistencia a antimicrobianos en la cepa de mayor multiresistencia aislada, a través de la secuenciación de su genoma y posterior búsqueda de sus genes codificantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas utilizadas

Las cepas utilizadas para las pruebas de sensibilidad a antibióticos (PSA) corresponden a aislados obtenidos desde muestras de suelo antártico. Estas fueron previamente aisladas y codificadas bajo el proyecto INACH RT_51-16 dirigido por el Dr. Andrés Marcoleta. Dichas cepas provienen de cuatro zonas distintas: Isla Decepción, Península Coppermine, Base Yelcho (Isla Doumer) y Base Henryk Arctowski (Isla Rey Jorge) (**Figura 8**)

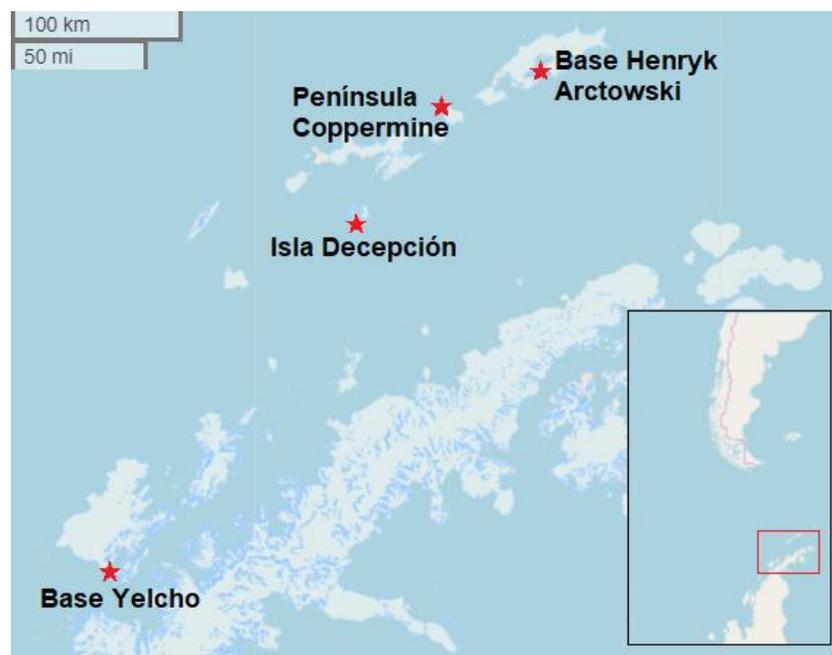


Figura 8: Mapa de la Península Antártica. Las estrellas indican las localidades muestreadas. Adaptado de (*OpenStreetMap*, s.f.) <https://www.openstreetmap.org/#map=6/-63.030/-59.150>

En cada zona, se colectaron dos muestras de suelo, la primera denominada “humanizada”, caracterizada por poseer un alto grado de intervención humana fue tomada dentro de la base antártica de la localidad o sus alrededores, buscando una zona construida o de alto tránsito. La segunda muestra, catalogada como “prístina” fue

recolectada de una zona protegida o de difícil acceso y no posee intervención humana aparente, en los alrededores no existía rastro visible de alteración humana. La codificación y el total de cepas analizadas por localización se muestran en **Tabla 1**.

Tabla 1: Cepas analizadas por cada zona muestreada.

Zona	Código	N° Cepas	Zona	Código	N° Cepas
Decepción humanizada	DeH	35	Yelcho humanizada	YeH	28
Decepción prístina	DeP	47	Yelcho prístina	YeP	5
Coppermine humanizada	CoH	30	Arctowski humanizada	ArH	20
Coppermine prístina	CoP	20	Arctowski prístina	ArP	44
N° total de cepas = 229					

3.2 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

Para la realización de pruebas de sensibilidad a antibióticos con bacterias antárticas se adaptó el método de difusión de discos recomendado por el Comité Europeo para el testeo de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST, 2017). A partir de aislados crecidos a 10°C en placas LB se realizaron inóculos en 2 mL de caldo mueller-Hinton (MH). Los inóculos se crecieron en tubos cónicos de 5 mL a 10°C con agitación por 48 h o hasta alcanzar la turbidez deseada. Posteriormente, se ajustó la DO₆₂₅ de cada cultivo a 0,3 diluyendo con el mismo medio MH para obtener 2 mL del cultivo ajustado. El cultivo ajustado se plaqueó con torula en agar MH para formar un césped. El rayado se repitió tres veces girando la placa en 60° entre cada repetición. Posteriormente, discos con cantidades conocidas de distintos antibióticos (Oxoid) fueron aplicados sobre las placas previamente rayadas utilizando un dispensador diseñado para ello (Oxoid). Se utilizaron los siguientes antibióticos del catálogo comercial de Oxoid: amikacina 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, ceftarolina 5 µg, colistina 10

μg, clindamicina 2 μg, eritromicina 15 μg, cefepima 30 μg, fosfomicina/trometramol 200 μg, linezolid 30 μg, meropenem 10 μg, rifampicina 5 μg, trimetoprima/sulfametoxazol 25 μg, tigeciclina 15 μg, piperacilina/tazobactam 110 μg y vancomicina 30 μg. Los 15 antibióticos se ordenaron alfabéticamente y se dividieron en 3 placas (las dos primeras placas con 6 discos cada una y la restante con 3). Durante todo el procedimiento las placas se manejaron lo más rápido posible manteniéndolas, una vez usadas, alejadas del mechero, mientras que los cultivos líquidos se mantuvieron en hielo para una posible pérdida de viabilidad de las cepas antárticas por exposición al calor. Las placas se incubaron a 10°C durante una semana, tras lo cual se realizó la observación y registro de resultados. Para los análisis se consideró la cepa como sensible cuando se registró un halo de inhibición de crecimiento de un diámetro igual o mayor a 10 mm. Para el análisis detallado del perfil de resistencia de *Pseudomonas* spp. YeP6b se agregó la categoría “resistencia parcial” para los casos en los que a pesar de apreciarse crecimiento del césped en la zona de 10 mm alrededor del disco se observaba una reducción en su densidad.

3.3 Genotipificación de bacterias antárticas

Las cepas que mostraron resistencia a 7 o más antibióticos, o bien aquellas resistentes a amikacina y/o piperacilina/tazobactam (los cuales mostraron una alta efectividad sobre la colección de cepas probada) fueron seleccionadas para su identificación taxonómica mediante el análisis de la secuencia 16S rRNA. Para la amplificación del gen 16S rRNA se realizaron PCRs de colonia. Para preparar el DNA se diluyó una colonia en 200 μL de H₂O_{np} y se calentó a 90°C por 10 minutos. Se tomaron 2 μL desde la superficie de la solución y se agregó al tubo PCR con el mix

preparado de manera estándar, obteniendo un volumen final de 25 µL por reacción.

Los partidores utilizados fueron los siguientes:

16SF: 5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

16SR: 5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT

Los amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa 1% (2 carriles por muestra) a 100 V por 40 min. Las bandas (~1,5 kb) se visualizaron con UV, se cortaron y se purificaron utilizando el KIT GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Sigma-Aldrich) según el manual del fabricante. El DNA se secuenció por el método Sanger automatizado usando los servicios de la empresa Macrogen.

Los extremos de las secuencias del 16S fueron cortados manualmente según calidad utilizando la herramienta de visualización de SnapGene (GSL Biotech). Las secuencias finales se compararon con la base de datos del NCBI utilizando Blast (Altschul, 1997). Se consideraron los 4 primeros resultados entregados, teniendo en cuenta el mayor porcentaje de identidad y cobertura.

Para la identificación a nivel de especie de la cepa cuyo genoma fue secuenciado, se llevó a cabo un análisis rMLST (Ribosomal Multilocus Sequence Typing) (Jolley et al., 2012) utilizando la base de datos PubMLST.org (Jolley & Maiden, 2014) junto con el software BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database) (Jolley & Maiden, 2010) disponible en la misma web.

3.4 Extracción de DNA genómico para secuenciación masiva

Se extrajo DNA genómico de la cepa de mayor multirresistencia (YeP6b) para la secuenciación completa de su genoma. Para la extracción se utilizó el kit comercial GenJet genomic DNA purification (ThermoFisher) siguiendo el manual del fabricante.

Se verificó la integridad del DNA tras visualizarlo en gel de agarosa 1% (100 V x 40 min). La mitad del DNA extraído se secuenció usando la tecnología Illumina a través de los servicios de Macrogen (quienes estuvieron a cargo tanto de la preparación de la librería como de la secuenciación), mientras que la otra mitad se almacenó para la preparación de la librería y posterior secuenciación usando la tecnología MinION (Oxford Nanopore).

3.5 Preparación de la librería y secuenciación con MinION

El kit de secuenciación utilizado ofrece un método flexible para preparar librerías de secuenciación a partir de un input de 4 µg de DNA genómico doble hebra y de alto peso molecular (> 50 kb). La preparación de la librería consistió en la fragmentación del DNA de forma mecánica en trozos de 8 kb, reparación de los extremos, ligación de cola poli A, y unión a ésta del adaptador. Entre cada paso, el DNA es seleccionado y purificado a través de beads magnéticos que unen DNA. Para la preparación de la librería se utilizó el kit Ligation Sequencing SQK-LSK108 (Oxford Nanopore), junto con los siguientes reactivos y materiales: AMPure XP (BECKMAN COULTER), g-TUBE™ para la fragmentación del DNA (Covaris), NEBNext® FFPE DNA Repair Mix (New England Biolabs), NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (New England Biolabs), Blunt/TA Ligase Master Mix (New England Biolabs).

Todo el procedimiento se llevó a cabo en las dependencias del laboratorio de Bioinformática y Expresión Genética (LBEG) del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA), en colaboración con el Dr. Mauricio González y Alexis Gaete.

3.6 Ensamblaje y anotación del Genoma de *Pseudomonas* spp. YeP6b

Los datos de secuenciación se cargaron en la plataforma web “Galaxy” (<https://galaxyproject.org>), y se usó el servidor público en usegalaxy.org para analizar los datos (Afgan et al., 2018). Se evaluó la calidad de las lecturas con FASTQC (Andrews, 2018). Las secuencias Illumina fueron filtradas por calidad usando la herramienta Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Las secuencias Nanopore (MinION) fueron filtradas por calidad y se le removieron los adaptadores usando las herramientas Porechop (<https://github.com/rrwick/Porechop>) y NanoFilt (De Coster et al., 2018). El ensamblaje se realizó combinando las lecturas de MinION e Illumina usando Unicycler en el modo de ensamblaje híbrido (Wick et al., 2017). Se evaluó la calidad del ensamblaje con la herramienta QUAST (Gurevich et al., 2013). Finalmente, el genoma ensamblado fue anotado utilizando la herramienta RASTtk (Brettin et al., 2015).

3.7 Análisis bioinformático del perfil de resistencia a antimicrobianos

La identificación de genes asociados a resistencia a antimicrobianos (AMR) se realizó utilizando las plataformas PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) (Wattam et al., 2016), CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (Jia et al., 2016), y NDARO (National Database of Antibiotic Resistant Organisms). Dichas herramientas se utilizaron para la generación del perfil de resistencia de la cepa YeP6b y las otras cepas de *Pseudomonas* utilizadas para la comparación. Para estos análisis, los genomas fueron re-anotados usando las herramientas disponibles en cada plataforma. Los datos fueron descargados como tablas y trabajados en Excel. Para la construcción del mapa de calor (heatmap), los genes se agruparon en las diferentes categorías y se contaron manualmente. El 0% se definió como completa ausencia

(recuento = 0), mientras que el 100% fue el recuento más alto (entre las cepas utilizadas en el análisis) para cada categoría.

3.8 Análisis de perfiles ocultos de Markov (HMMs)

A partir del genoma anotado, se extrajeron las secuencias de las proteínas sin asignación funcional (proteínas hipotéticas). Usando la herramienta HMMER (v3.1b1) y el comando “hmmscan” (Eddy, 2011), se contrastaron las secuencias con las bases de datos de perfiles HMM pFam (El-Gebali et al., 2019) y Resfams (Gibson et al., 2014). Para identificar los dominios asociados a determinantes de resistencia a antibióticos, los resultados se filtraron utilizando la base de datos FARME (Functional Antibiotic Resistant Metagenomic Element) (Wallace et al., 2017).

3.9 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism v8.0.2. Para la comparación de los índices de resistencia (**Tabla 3**) se consideró el escenario como un estudio retrospectivo de casos y controles, por lo cual los datos se ordenaron en tablas de contingencia aplicándoseles la prueba exacta de Fisher’s con una significancia del 5% (doble cola), mientras que el intervalo de confianza para la razón de probabilidad de la población fue calculado por el método Baptista-Pike. (Motulsky, 2016).

Para la comparación de la distribución del número de resistencias (**Figura 11**), se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para dos muestras independientes con una significancia del 5% (doble cola) (Motulsky, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Resistencia a antibióticos en bacterias aisladas desde distintas zonas del continente antártico.

A través del método de difusión de discos (EUCAST, 2017) se comprobó la susceptibilidad a 15 antibióticos de diferentes familias (**Anexo II**) de 229 cepas aisladas desde muestras de suelo antártico. Las cepas se clasificaron en “Resistentes” o “Sensibles” para cada antibiótico (**Figura 9**). El antibiótico que mostró menor eficacia fue fosfomicina, donde el 53,7% de cepas analizadas presentó resistencia a este antimicrobiano. Colistina y clindamicina le siguen con índices de resistencia mayores al 25%. En contraste, los antibióticos meropenem y tigeciclina fueron capaces de inhibir el crecimiento de todos los aislados probados, mientras que piperacilina/tazobactam y amikacina inhibieron el crecimiento de más del 96% de las cepas probadas.

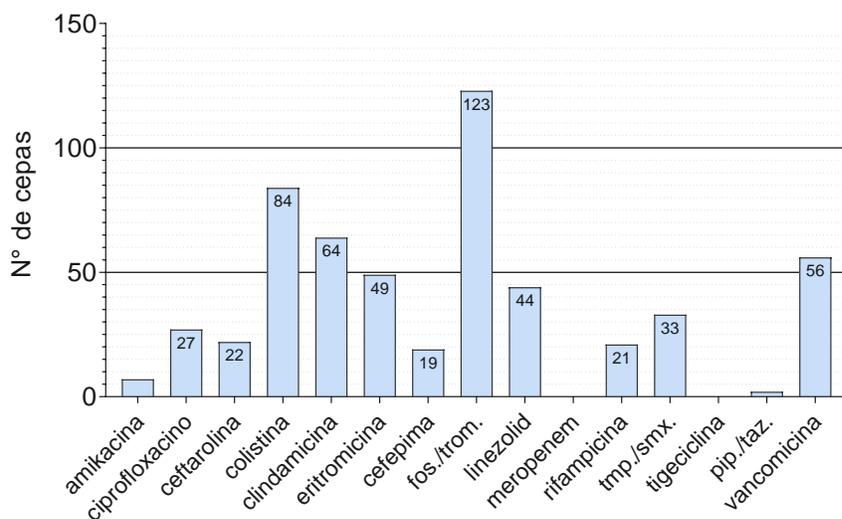


Figura 9: Total de aislados resistentes para cada antibiótico probado. Número de cepas resistentes de un total de 229 para cada uno de los 15 antibióticos probados.

Posteriormente, se evaluó la resistencia a distintos antibióticos agrupando las cepas según su procedencia. Para facilitar la comparación las cantidades se

expresaron en medida porcentual (número de cepas resistentes al antibiótico entre las cepas totales por cada localidad muestreada). En 3 de las 4 localidades las cepas de zonas prístinas mostraron un mayor porcentaje de resistencia para la mayoría de los antibióticos probados que su variante humanizada. Por otra parte, en las muestras aisladas de zonas humanizadas de la isla Decepción y la península de Coppermine sólo se observaron altos índices de resistencia a los antibióticos fosfomicina, colistina y ciprofloxacino; mientras que las muestras originarias de las bases Yelcho y Henryk Arctowski (zonas humanizadas) presentaron resistencia a una mayor variedad de antibióticos, similar a las muestras derivadas de localidades prístinas (**Tabla 2**).

Tabla 2: Comparación del porcentaje de aislados resistentes entre zonas humanizadas y prístinas. Porcentaje de cepas resistentes por antibiótico en cada localización. H, muestras de zonas humanizadas; P, muestras de zonas prístinas.

Antibióticos	Decepción		Coopermine		Yelcho		Arctowski	
	H(%)	P(%)	H(%)	P(%)	H(%)	P(%)	H(%)	P(%)
Amikacina	0,0	4,3	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1
Ciprofloxacino	37,1	2,1	23,3	5,0	3,6	0,0	15,0	2,3
Ceftarolina	0,0	17,0	0,0	20,0	14,3	40,0	5,0	6,8
Colistina	48,6	17,0	50,0	50,0	17,9	60,0	45,0	38,6
Clindamicina	8,6	44,7	3,3	60,0	25,0	60,0	40,0	20,5
Eritromicina	2,9	40,4	3,3	55,0	17,9	60,0	15,0	13,6
Cefepima	5,7	14,9	0,0	10,0	0,0	60,0	5,0	9,1
Fosfomicina/ trometamol	80,0	34,0	70,0	65,0	25,0	80,0	35,0	61,4
Linezolid	5,7	31,9	0,0	55,0	17,9	60,0	15,0	11,4
Meropenem	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rifampicina	0,0	10,6	6,7	40,0	14,3	20,0	0,0	2,3
Trimetoprima/ sulfametoxazol	0,0	31,9	0,0	10,0	17,9	60,0	20,0	9,1
Tigeciclina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Piperacilina/ tazobactam	0,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3
Vancomicina	2,9	46,8	3,3	55,0	25,0	80,0	25,0	11,4

Dado el carácter categórico de los resultados (resistente/sensible), para la comparación estadística entre los grupos humanizado y prístino, se clasificó la totalidad de los aislados por su procedencia ordenando los datos por antibiótico en tablas de contingencia (no mostradas). Debido al tamaño muestral se optó por calcular la significancia estadística usando la prueba exacta de Fisher's (**Tabla 3**). Al ser un ensayo retrospectivo, la razón de probabilidad (OR) puede ser interpretada como el riesgo relativo, es decir, cuantas veces es más probable encontrar la resistencia al determinado antibiótico en una muestra prístina vs. una humanizada (Motulsky, 2016).

Tabla 3: Comparación de los índices de resistencia a antibióticos de los aislados bacterianos procedentes de zonas con o sin intervención humana. Los resultados provienen del análisis acumulado de los datos de la **Tabla 2**

Antibióticos	Pristina (n=116)		Humanizada (n=113)		Estadísticos ¹		
	n	%	n	%	p-valor	OR	95% CI
Amikacina	6	5,2	1	0,9	0,1195	-	-
Ciprofloxacino	3	2,6	24	21,2	<0,0001	0,10	0,03 a 0,33
Ceftarolina	17	14,7	5	4,4	0,0123	3,71	1,32 a 9,42
Colistina	38	32,8	46	40,7	0,2205	-	-
Clindamicina	45	38,8	19	16,8	0,0002	3,14	1,70 a 5,66
Eritromicina	39	33,6	10	8,8	<0,0001	5,22	2,41 a 10,54
Cefepima	16	13,8	3	2,7	0,0031	5,87	1,76 a 19,35
Fosfomicina/ trometamol	60	51,7	63	55,8	0,5966	-	-
Linezolid	34	29,3	10	8,8	<0,0001	4,27	2,05 a 8,69
Meropenem	0	0,0	0	0,0	-	-	-
Rifampicina	15	12,9	6	5,3	0,0654	-	-
Trimetoprima/ sulfametoxazol	24	20,7	9	8,0	0,0079	3,01	1,39 a 7,03
Tigeciclina	0	0,0	0	0,0	-	-	-
Piperacilina/ tazobactam	2	1,7	0	0,0	0,4979	-	-
Vancomicina	42	36,2	14	12,4	<0,0001	4,01	2,09 a 7,89

¹ significancia al 5%; p-valor calculado usando la prueba exacta de Fisher de doble cola (two-tailed Fisher's exact test); OR, razón de probabilidad de los resultados estadísticamente significativos ($p < 0,05$); 95% CI, Intervalo de confianza de la razón de probabilidad para la población, calculado por el método Baptista-Pike.

Para 7 de los 15 antibióticos no fue posible asociar una influencia significativa de la procedencia de la muestra al fenotipo de resistencia. En cuanto a los demás antimicrobianos, ciprofloxacino fue el único cuyo fenotipo de resistencia se relacionó directamente a la influencia humana, existiendo alrededor de 10 veces más probabilidad de encontrar dicho fenotipo en zonas humanizadas. Sin embargo, para los 7 antibióticos restantes se asoció un efecto inverso, siendo entre 3 y 6 veces más probable encontrar el fenotipo de resistencia en un aislado proveniente de una zona prístina que de una humanizada.

En resumen, se observaron altos índices de resistencia tanto en muestras humanizadas como prístinas, aunque resistencia a una mayor variedad de antibióticos en estas últimas. En general, los resultados obtenidos indican que no existe un mayor número de bacterias resistentes a antibióticos en zonas humanizadas de la Antártica, comparado con zonas prístinas.

A continuación, se evaluó el número de aislados resistentes a múltiples antibióticos obtenidos a partir de las distintas zonas. Para ello, las cepas fueron ordenadas según la cantidad de resistencias simultáneas presentadas, obteniéndose valores entre 0 y 10. Las cepas se clasificaron según su procedencia de zonas con intervención humana o zonas prístinas. Del total de aislados el 21,8% fue resistente a 4 o más antimicrobianos. De estos, el 82% proviene de zonas prístinas. El 92% de cepas humanizadas se encuentran en el rango de resistencia de 3 antibióticos o menos, mientras solo el 64,7% de las cepas prístinas cumplen con esta condición. El 23,1% de las cepas probadas fueron sensibles a todos los antibióticos. (**Figura 10**).

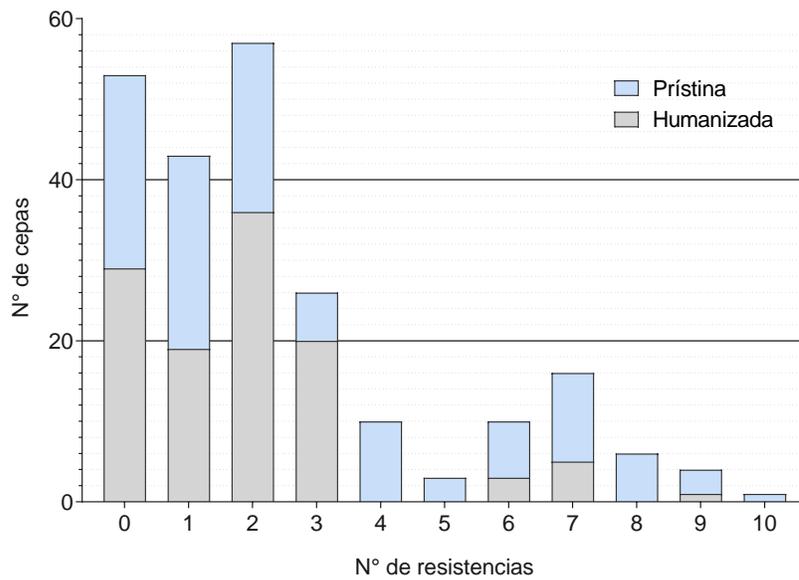


Figura 10: Cantidad de aislados multirresistentes clasificados según su procedencia humanizada o prístina. Número de cepas resistentes simultáneamente a la cantidad indicada de distintos antibióticos.

Para el posterior análisis estadístico se calculó el número de resistencias promedio agrupando los datos según su procedencia prístina o humanizada. (**Figura 11**). Se obtuvo un valor promedio de 2,96 resistencias simultáneas para las muestras prístinas y 1,86 para las muestras humanizadas, con desviaciones estándar de 2,80 y 1,83, respectivamente. Los análisis reafirman los resultados observados anteriormente, siendo las muestras de procedencia prístinas significativamente resistentes a un mayor número de antibióticos que las humanizadas (p -valor = 0,0274).

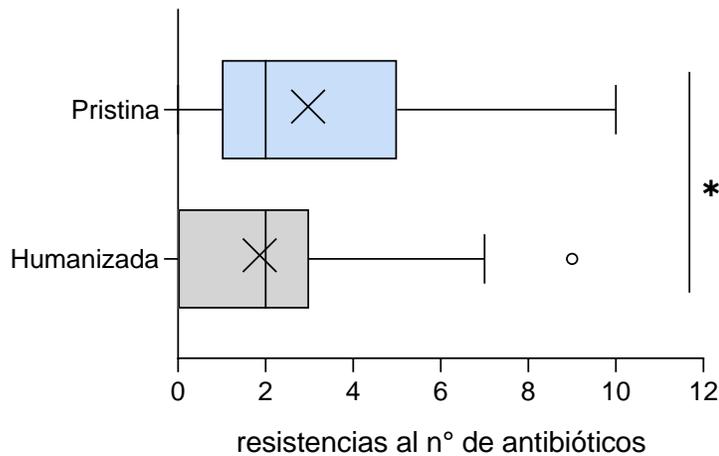


Figura 11: Comparación del número de resistencias promedio entre aislados provenientes de zonas prístinas y humanizadas. Gráfico de cajas que muestra la distribución del número de resistencia en aislados procedentes de las 4 localidades muestreadas. Las cajas indican cuartiles superior e inferior, las barras indican valores mínimos y máximos, excluyendo valores atípicos. (o) representa valores atípicos (según test de Turkey) mientras que (x) señala el valor promedio. (*) Indica significancia estadística calculada con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para dos muestras independientes ($p < 0.05$; dos colas).

Finalmente, se determinó el porcentaje de aislados multirresistentes por cada zona muestreada, contrastando siempre entre las variantes prístinas y humanizadas de una misma localización. Para todas las locaciones se obtuvieron índices mayores de multirresistencia en las variantes prístinas respecto a las humanizadas de la misma zona (**Figura 12**).

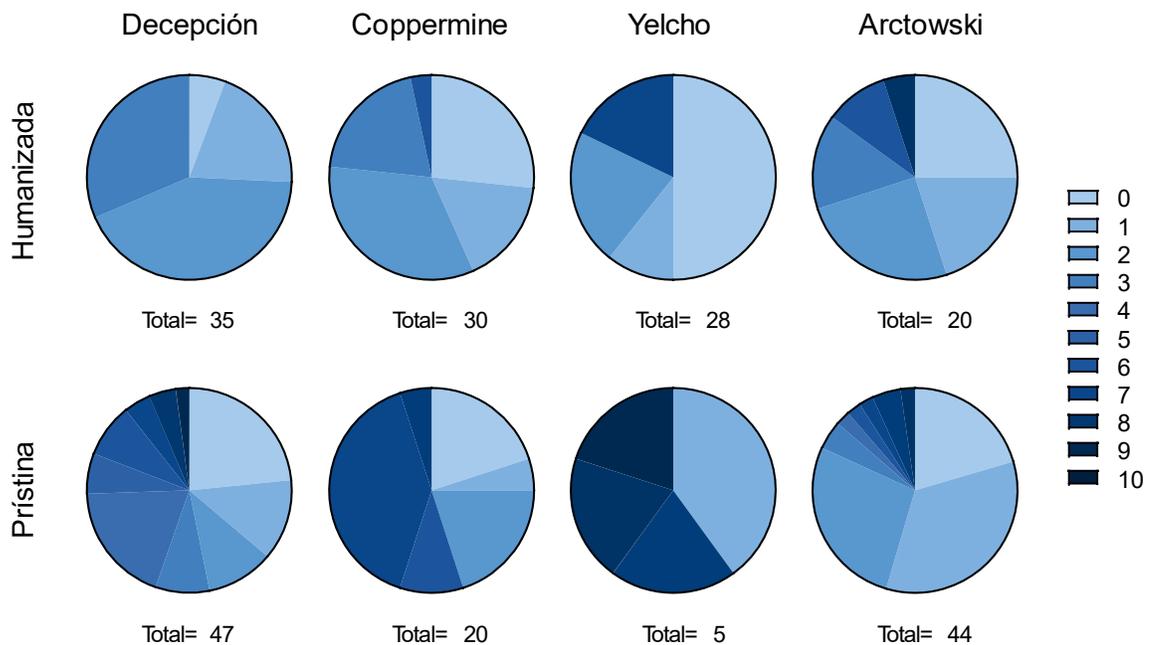


Figura 12: Comparación del porcentaje de aislados con resistencia a múltiples antibióticos en cada zona muestreada. Porcentaje de cepas resistentes simultáneamente a la cantidad indicada de distintos antibióticos. Cepas separadas por localización. Las etiquetas interiores indican el número de cepas. La gradiente de color indica el número de resistencia simultáneas (de 0 a 10), colores más oscuros representan mayor multirresistencia.

4.2 Identificación y clasificación taxonómica de los aislados antárticos más relevantes

Los aislados que presentaron resistencia a 7 o más de los antibióticos probados, o resistencia a los antibióticos con mayor índice de sensibilidad en nuestras muestras (amikacina y piperacilina/tazobactam) fueron clasificados taxonómicamente según su secuencia codificante del RNA ribosomal 16S. Por este método sólo fue posible resolver la filogenia de cada cepa a nivel de género, identificándose 7 distintos. De las 31 cepas seleccionadas el 77,4% corresponden a *Pseudomonas*, número que aumenta a 88,9% si sólo se consideran las cepas resistentes a 7 o más antibióticos. En cuanto a las cepas resistentes a amikacina o piperacilina/tazobactam se obtuvo mayor diversidad, perteneciendo cada una a géneros distintos (**Tabla 4**).

Tabla 4: Taxonomía de las aisladas de mayor multirresistencia.

Cepa	N° Resistencias	Género	Cepa	N° Resistencias	Género
YeP6b	10	<i>Pseudomonas</i>	CoP5c	7	<i>Pseudomonas</i>
ArH3a	9	<i>Pseudomonas</i>	CoP6a	7	<i>Pseudomonas</i>
ArP4f	9	<i>Pseudomonas</i>	CoP9a	7	<i>Pseudomonas</i>
DeP13a	9	<i>Pedobacter</i>	CoP9c	7	<i>Pseudomonas</i>
YeP6a	9	<i>Pseudomonas</i>	DeP13h	7	<i>Pseudomonas</i>
ArP4e	8	<i>Pseudomonas</i>	DeP31h	7	<i>Pseudomonas</i>
ArP5a	8	<i>Pseudomonas</i>	YeH3d	7	<i>Pseudomonas</i>
CoP1a	8	<i>Pseudomonas</i>	YeH3e	7	<i>Pseudomonas</i>
DeP18a	8	<i>Pseudomonas</i>	YeH3f	7	<i>Pseudomonas</i>
DeP37a	8	<i>Pseudomonas</i>	YeH5a	7	<i>Pseudomonas</i>
YeP2a	8	<i>Pseudomonas</i>	YeH9a	7	<i>Pseudomonas</i>
ArP4d	7	<i>Paeniglutamicibacter</i>	ArP27a	4, TZP	<i>Microbacterium</i>
CoP10a	7	<i>Pseudomonas</i>	CoH12a	3, AK	<i>Arthrobacter</i>
CoP2a	7	<i>Pseudomonas</i>	ArP26c	2, AK	<i>Flavobacterium</i>
CoP3d	7	<i>Arthrobacter</i>	DeP11a	1, TZP	<i>Acinetobacter</i>
CoP5a	7	<i>Pseudomonas</i>			

Aparentemente *Pseudomonas* representa el género más abundante de bacterias multirresistentes cultivables en las muestras analizadas. Sin embargo, esto no implica la inexistencia de diversidad en el suelo, ya que, al dejar de seleccionar por multirresistencia diferentes géneros emergen.

4.3 Secuenciación y análisis genómico del aislado *Pseudomonas* spp. YeP6b

La cepa *Pseudomonas* spp. YeP6b, la cual mostró la mayor multirresistencia en las pruebas de sensibilidad a antibióticos, fue seleccionada para secuenciar y analizar en detalle su genoma, con un especial foco en los posibles determinantes genéticos que darían cuenta de su multiresistencia. Adicionalmente, para fines comparativos se incluyeron en los análisis: 1) la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA7 como modelo de *Pseudomonas* multirresistente a antibióticos (Roy et al., 2010) y 2) la cepa psicrófila

con actividad antimicrobiana aislada de una muestra de agua dulce antártica *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494 (Lee et al., 2017), elegida por ser una cepa secuenciada filogenéticamente cercana a la nuestra.

El genoma completo de la cepa *Pseudomonas* spp. YeP6b fue secuenciado usando las tecnologías de secuenciación masiva Illumina y Nanopore MinION. La secuenciación Illumina generó 38,14 Mill. lecturas (5,76 Gpb), mientras que la secuenciación Nanopore generó 1,17 Mill. lecturas (8,02 Gpb). Luego de filtrar ambos sets de lecturas por calidad y remover los adaptadores usados durante la secuenciación, se realizó el ensamblaje híbrido usando la herramienta Unicycler. De esta manera, se obtuvo un cromosoma circular cerrado de 6,66 Mpb, no detectándose la existencia de plásmidos (**Figura 13**). La cobertura promedio del cromosoma fue de ~750X, calculada como el total de bases incorporadas al ensamblaje dividido por el tamaño total del genoma. Respecto al cromosoma, éste posee una longitud similar a la observada en el psicrófilo *Pseudomonas aeruginosa* PAMC 27494 (6,61 Mpb) y en la cepa multirresistente *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (6,59 Mpb), y un contenido GC de 59,68%, similar al de la cepa PAMC 27492 pero inferior al 66,4% observado en PA7 (Winsor et al., 2016).

Una vez ensamblado, el genoma se anotó con las herramientas disponibles en la plataforma PATRIC (Wattam et al., 2016). Se encontraron 6142 CDS, siendo posible la asignación funcional en un 76,6% de ellos. Posteriormente, utilizando las herramientas EvalG y EvalCon (Parks et al., 2014) se comprobó la calidad del ensamblaje y anotación. EvalG verifica la integridad y la contaminación del genoma identificando roles funcionales universales que se espera encontrar exactamente una vez en todos los genomas de un grupo taxonómico particular. Los roles faltantes indican que el genoma está menos completo; roles adicionales indican que el genoma

puede estar contaminado. El análisis arrojó una integridad del 99,6% y una contaminación del 1,7%. EvalCon verifica la consistencia de la anotación del genoma. Para esto realiza asociaciones entre los roles funcionales determinando cuántas instancias de cada rol se esperan dada la lista de otros roles en el genoma. Si un rol en el genoma es inesperado, o falta un rol esperado, esto se considera una inconsistencia general. Si un rol ocurre un número diferente de veces de lo previsto, esto es una inconsistencia fina. La herramienta predijo una consistencia general del 98,4% y una consistencia fina del 95%. Un genoma se considera de buena calidad cuando posee una integridad mayor al 80% una contaminación menor que 10% y una consistencia mayor al 87% (Wattam et al., 2016). En base a lo anterior, los análisis muestran una excelente calidad del genoma, con una longitud esperada para *Pseudomonas* y un contenido GC cercano a lo reportado en otra *Pseudomonas* antártica. Los principales resultados del ensamblaje y la anotación se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Principales características del genoma de *Pseudomonas* spp. YeP6b.

	YeP6b Cromosoma
Longitud	6,66 Mpb
Contenido GC	59,68 %
Secuencias codificantes	6142
Regiones repetidas	221
tRNAs	67
rRNAs	19
Proteínas hipotéticas	1436
Proteínas con asignación funcional	4706
Integridad	99,6%
Contaminación	1,7%
Consistencia general	98,4%
Consistencia fina	95,0%

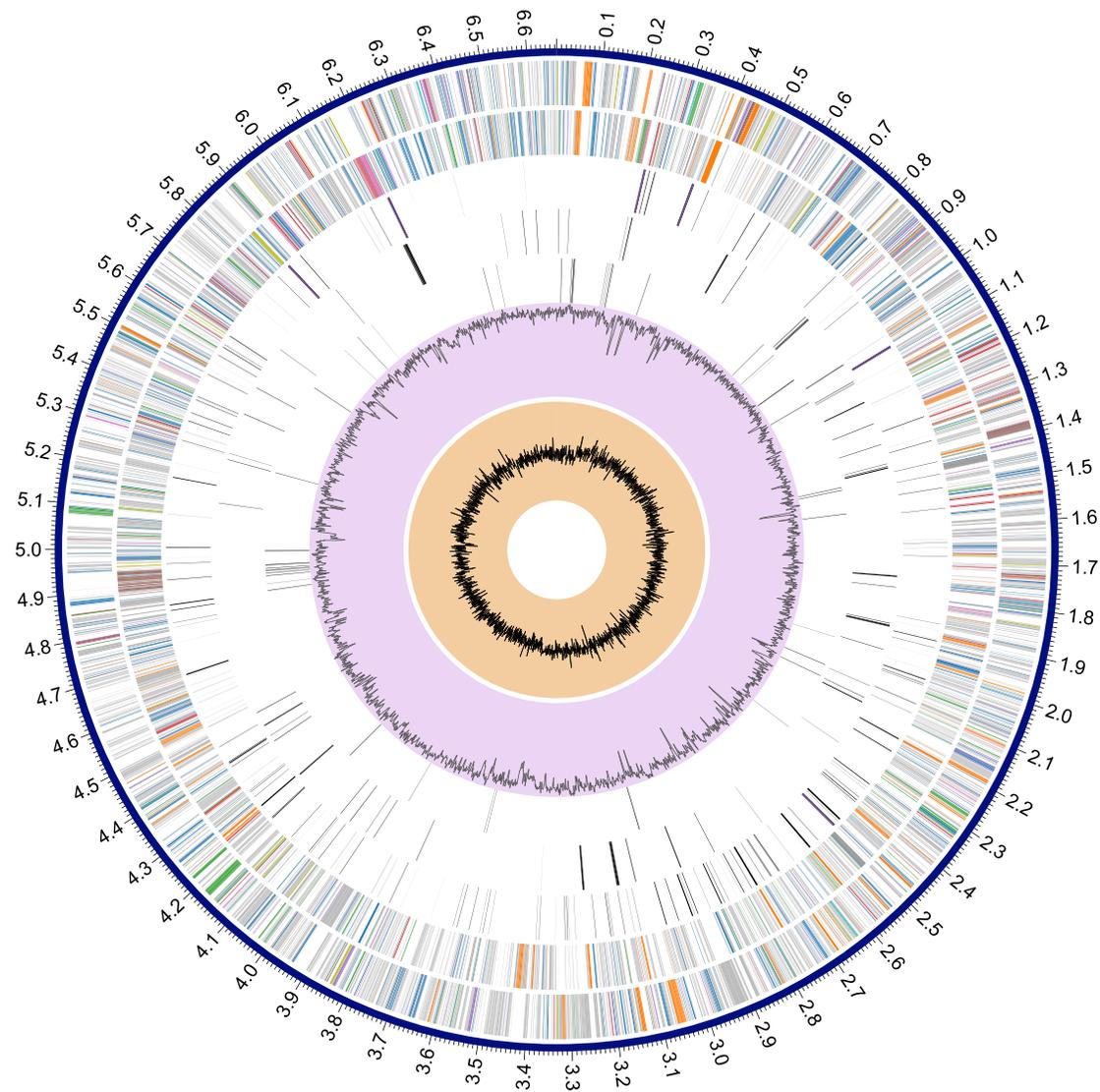


Figura 13: Mapa cromosómico del aislado antártico multirresistente *Pseudomonas* spp. YeP6b. Visualización gráfica circular de la distribución de las anotaciones del genoma. Esto incluye, desde los anillos externos al interior, los contigs (en este caso es un único segmento), genes que codifican proteínas (CDS) en la cadena directa, CDS en la cadena inversa, genes de RNA, CDS con homología a los genes de resistencia antimicrobiana conocidos, CDS con homología para los factores de virulencia conocidos, contenido de GC y desviación de GC. Los colores de los CDS en la cadena directa e inversa indican el subsistema al que pertenecen estos genes (**Figura 14**).

Con el objeto de tener una visión general de las funciones codificadas en el genoma de *Pseudomonas* spp. YeP6b, usando la herramienta PATRIC se realizó la categorización funcional de su proteoma en subsistemas, contando las proteínas

pertenecientes a cada categoría. Un subsistema es un conjunto de proteínas que juntas implementan un proceso biológico específico o complejo estructural (Overbeek et al., 2005). La mencionada herramienta permitió la clasificación del 40% de los CDS totales. Cabe destacar que más de la mitad de las proteínas identificadas poseen función metabólica o de transporte de membrana. También destacan proteínas de respuesta estrés, energía y procesamiento de proteínas (**Figura 14**). En general para todas las categorías se detectaron menos genes que en la cepa de referencia PA7.

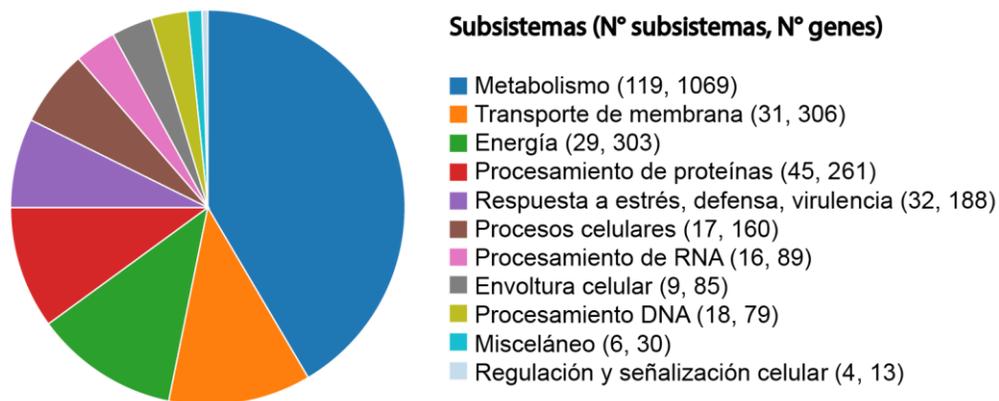


Figura 14: Categorización funcional del proteoma de *Pseudomonas* spp. YeP6b en distintos subsistemas. La primera cifra dentro del paréntesis indica el número de subsistemas encontrados para cada genoma pertenecientes a la categoría indicada. La segunda cifra representa el número de genes encontrados que conforman esos subsistemas.

Finalmente se realizó un análisis rMLST (Ribosomal Multilocus Sequence Typing) para tratar de identificar la especie de la cepa YeP6b y en el caso de ser conocida la cepa misma. El análisis utiliza la variación de los 53 genes que codifican las subunidades de las proteínas ribosomales bacterianas (genes *rps*) como un medio para tipificar el organismo llegando al nivel de cepa (Jolley et al., 2012). Sin embargo, el análisis no logró identificar ni siquiera la especie entregando como opción más cercana *Pseudomonas fluorescens* con un 20% de soporte. De los 53 genes se encontraron 44 coincidencias exactas, no obstante, estas coincidencias eran

incongruentes entre si ya que estaban asociadas a distintas especies. Los resultados sugieren que la cepa YeP6b pertenece a una nueva especie.

4.4 Identificación de genes asociados a resistencia a antibióticos

Para identificar posibles genes asociados a mecanismos de resistencia a antibióticos codificados en el genoma de *Pseudomonas* spp. YeP6b y comparar dicho resistoma con el perteneciente a la cepa multirresistente *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (Roy et al., 2010) y el psicrófilo antártico PAMC 27494 (Lee et al., 2017), los genomas de dichas cepas fueron analizados con la plataforma PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) para la identificación de determinantes de resistencia. Los determinantes de resistencia se contaron y agruparon en categorías (**Tabla 6**) para su posterior representación en un mapa de calor (**Figura 15A**). *Pseudomonas* YeP6b destacó por poseer una amplia batería de sistemas de eflujo de diversas familias, incluyendo las de tipo RND: MexAB, MexEF, MexJK, MdtABC; EmrAB, de tipo MFS; y TriABC y MacAB, de tipo ABC. Además, se identificaron mutaciones en blancos de antibióticos asociadas a resistencia, incluyendo DNA topoisomerasas, proteínas ribosomales, polimerasas, factores de transcripción y diversas enzimas como MurA o DHFR, entre otras. Adicionalmente, se encontraron betalactamasas de clase C (*ampC*) y aminoglucósido fosfotransferasas (APH). Sin embargo, en comparación con las cepas de referencia posee un conteo menor de genes, en especial en cuanto a porinas, además de varias categorías ausentes al confrontarlo con la cepa multirresistente PA7, como el transportador de cloranfenicol, enzimas de modificación del lípido A y reguladores transcripcionales. A pesar de lo anterior, en las pruebas fenotípicas YeP6b demostró resistencia a un mayor número de antibióticos que la cepa PAMC 27494, resistiendo a 3 antibióticos extra: cefepima, fosfomicina y rifampicina

(Figura 15B). En cambio, al comparar con la multiresistente PA7, nuestra cepa solo posee una resistencia extra: colistina, mientras que PA7 posee dos resistencias extra: amikacina y ciprofloxacino distanciándose del perfil de YeP6b.

En definitiva, el número de genes AMR identificados en el genoma de la cepa YeP6b resultó ser reducido como para dar cuenta del fenotipo de multiresistencia, sobretodo al compararlo con las cepas *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494 y *Pseudomonas aeruginosa* PA7. Lo anterior sugiere fuertemente que esta cepa posee mecanismos nuevos de resistencia cuyos determinantes genéticos no se encuentran representados en las bases de datos utilizadas.

Tabla 6: Conteo total de genes AMR. Muestra el total de genes AMR por cepa según la anotación y análisis realizado en PATRIC (Wattam et al., 2016). Los genomas de referencia PAMC 27494 y PA7 se obtuvieron de la base de datos de la misma plataforma.

	YeP6b	27494	PA7
Total de genes AMR	79	92	129

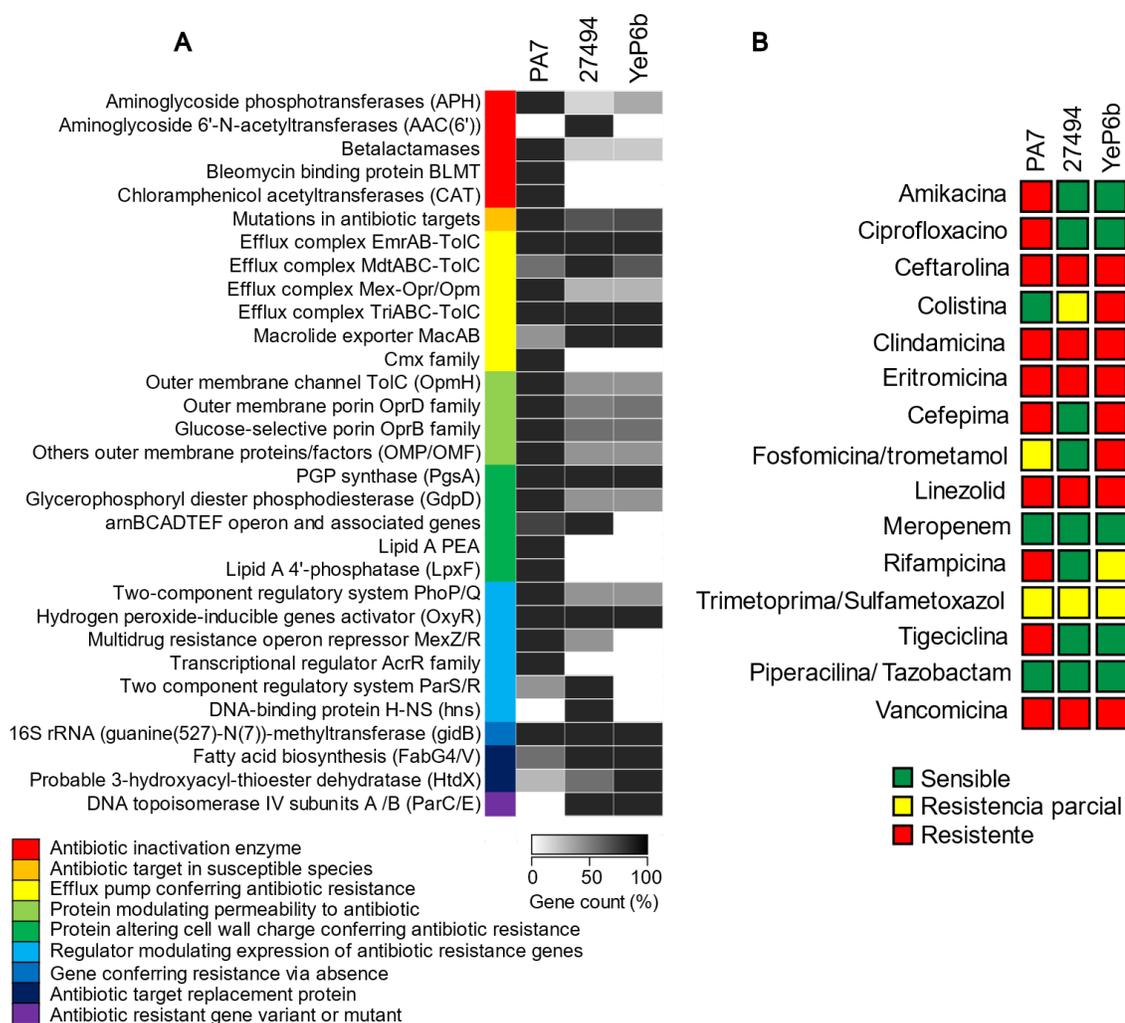


Figura 15: Propiedades de resistencia antimicrobiana del aislado antártico *Pseudomonas* spp. YeP6b y de otras cepas de este género. (A) Perfil de resistencia a antimicrobianos basado en los análisis genómicos. Los factores asociados a la resistencia a los medicamentos se agruparon en las diferentes categorías que se simbolizan con diferentes colores. La gradiente de color representa el recuento de genes para cada categoría en cada cepa. El tono más oscuro (100%) corresponde al mayor número de genes encontrados en cada categoría entre todas las cepas. (B) Perfil de resistencia a antimicrobianos determinado por ensayos de difusión en discos. El perfil mostrado para *P. aeruginosa* PA7 se construyó basándose en resultados de pruebas de sensibilidad reportadas en la literatura.

4.5 Identificación de posibles nuevos genes de resistencia a antibióticos en *Pseudomonas* spp. YeP6b

Como una primera aproximación para identificar posibles nuevos genes que pudiesen dar cuenta del fenotipo de multiresistencia de la cepa YeP6b, se realizó un análisis de perfiles en base a modelos ocultos de Markov (HMM, Hidden Markov Model). Un perfil HMM es una descripción de un consenso de zonas conservadas de una familia de proteínas, originada de un alineamiento múltiple entre éstas. Este método permite identificar dominios conservados asociados a proteínas conocidas en secuencias de proteínas de función desconocida. De esta forma se puede obtener un acercamiento a su función (Eddy, 1996).

Para el análisis se utilizaron las bases de datos Pfam y Resfams. Pfam es una gran colección de familias de proteínas, cada una representada por múltiples alineamientos de secuencias y modelos ocultos de Markov (El-Gebali et al., 2019). Por otra parte, Resfams es una base de datos de familias de proteínas y perfiles HMM asociados, confirmados para la función de resistencia a antibióticos (Gibson et al., 2014). Se compararon las proteínas clasificadas como hipotéticas de la cepa multirresistente YeP6b con la base de datos de Pfam, para identificar perfiles totales, y luego Resfams para la identificación de perfiles asociados a AMR. En el **Anexo III** se encuentran los resultados detallados obtenidos con Resfams. En la **Tabla 7** se muestra un resumen de los resultados del análisis.

Tabla 7: Resumen de los resultados del análisis de perfiles HMM. Los perfiles totales fueron determinados combinando los resultados obtenidos con las bases de datos Resfams y Pfam y eliminando las coincidencias. Los perfiles asociados a AMR corresponden a los encontrados utilizando solo Resfams.

	YeP6b
Proteínas hipotéticas	1421
Perfiles totales identificados	992
Proteínas con perfiles identificados	609
Perfiles asociados a AMR	111
Proteínas con perfiles asociados a AMR	40

Solo al 42,9% de las proteínas hipotéticas fue posible asignarle un perfil HMM. De estas, el 6,6% posee perfiles asociados a proteínas relacionadas con AMR. En total se detectaron 111 perfiles asociados a AMR distribuidos en 40 proteínas, de los cuales sólo 43 son únicos y el resto repeticiones. Los perfiles detectados corresponden en su mayoría a transportadores de membrana y sistemas de eflujo, en donde se encuentran sistemas MFS de eflujo de tetraciclina y transportadores ABC. Además, se hallaron perfiles de reguladores transcripcionales de genes AMR, principalmente reguladores de genes de resistencia a glucopéptidos y moduladores de los sistemas de eflujo. La última categoría que destacó fueron enzimas de inactivación de antibiótico, encontrándose perfiles asociados a aminoglucósido acetiltransferasas, cloranfenicol fosfotransferasas, metiltransferasas y diversas betalactamasas de clase C y dos de clase B. A pesar de que las proteínas encontradas aumentarían el número de genes AMR hasta un conteo superior al obtenido en la cepa PAMC 27494 aún quedan fenotipos de resistencia (como a colistina) que no poseen asociado un claro mecanismo responsable de su resistencia. En definitiva, resulta probable la existencia de mecanismos no conocidos que darían cuenta de los altos índices de resistencia encontrados en los aislados ambientales prístinos, evidenciando la relevancia y el amplio desconocimiento del pool genético que conforma el resistoma de ambientes naturales ubicados en zonas remotas como la Península Antártica.

5. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

La creciente aparición de cepas bacterianas multirresistentes y la falta de antibióticos para combatirla ha provocado en la actualidad una crisis de salud pública (Smith et al., 2015). Es debatida la influencia humana en el problema, debido a que existen pruebas del origen natural de los mecanismos encargados de conferir esta resistencia (D'Costa et al., 2006). De lo anterior, surge la necesidad de buscar en el ambiente respuestas a estas interrogantes. En este contexto se enmarca nuestro trabajo, teniendo como objetivo evaluar la presencia de mecanismos de resistencia en ambientes naturales, usando como modelo la Antártica. Se aprovecharon las características de dicho territorio para comparar la presencia de determinantes de resistencia y de bacterias resistentes a distintas familias de antibióticos entre zonas prístinas y con intervención humana, con la finalidad de explorar el resistoma de la Península Antártica, y evaluar el impacto de la intervención humana en la presencia de bacterias resistentes en el suelo.

En un primer análisis se realizaron perfiles fenotípicos de resistencia a antimicrobianos de los distintos aislados recuperados de las zonas muestreadas. En los análisis por localización se compararon los aislados desde zonas humanizadas y prístinas. Particularmente en las variantes humanizadas de Coppermine y Deception se observaron resistencias a tres antibióticos que destacan en frecuencia sobre otras: fosfomicina, colistina y ciprofloxacino. En contraste, en las muestras prístinas de estas zonas los fenotipos de resistencia encontrados se distribuyen de manera más homogénea entre un mayor número de antibióticos. Esto se puede explicar en gran medida por la mayor multirresistencia que poseen los aislados de zonas prístinas.

Respecto a la multirresistencia, destacan los altos valores obtenidos principalmente por cepas aisladas desde sitios prístinos. A partir de las 4 resistencias simultaneas las cepas obtenidas desde sitios humanizados pierden presencia. Sólo 9 cepas resistentes a 4 o más antibióticos se obtuvieron desde estos sitios, *versus* 41 cepas con la misma característica desde sitios prístinos. Sin embargo, en valores reducidos de multirresistencia (3 o menos) la tendencia es inversa (104 humanizadas *versus* 75 prístinas). Los resultados muestran que no todas las cepas aisladas desde sitios prístinos son multirresistentes, pero las que lo son resisten a un alto número de antibióticos. Esto es un indicio de que las resistencias se mantienen juntas, ya sea por estar codificadas en islas genómicas o en plásmidos, lo cual es poco factible ya que se ha demostrado la baja abundancia de elementos genéticos móviles en suelo antártico (Van Goethem et al., 2018). Una explicación probable es que un único mecanismo funcione contra una amplia gama de antibióticos. Por la falta de elementos genéticos móviles mencionada y por la fuerte señal filogenética asociada a los genes AMR, Van Goethem (2018) concluye que los genes AMR en suelos prístinos representan genes históricos funcionales que confieren resistencia a los antibióticos naturales y cuya adquisición ancestral se mantiene por transferencia vertical.

Los análisis descritos muestran una abundante presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos tanto en muestras humanizadas como prístinas. Sin embargo, una mayor multirresistencia en las cepas aisladas de estas últimas. No se encontraron pruebas de que la actividad humana cause un aumento en la proporción de bacterias multiresistentes. Esto es una prueba fehaciente de la existencia de un reservorio de genes de resistencia en ambientes naturales prístinos, probablemente explicada por la competencia natural de los microorganismos en el ambiente.

Siguiendo con un análisis más detallado, las pruebas de sensibilidad a antibióticos mostraron altos índices de resistencia a varios de los antibióticos probados. Dos en particular presentaron los mayores valores. Fosfomicina con una incidencia mayor al 50%, es decir, más de la mitad de las cepas probadas mostraron resistencia, y colistina con una incidencia mayor a 33%. A estos le siguen clindamicina y vancomicina con índices de alrededor de 25%. Esto difiere de lo reportado en otros estudios donde los mayores índices de resistencia en aislados ambientales corresponden a betalactámicos (Walsh & Duffy, 2013). Contrariamente, en este trabajo los menores índices de resistencia se obtuvieron con dicha familia de antibióticos. Lo anterior puede explicarse al considerar que los betalactámicos usados (ceftarolina, cefepima, meropenem y piperacilina/tazobactam) son de última generación, caracterizándose por su amplio espectro y resistencia a betalactamasas. Walsh & Duffy (2013) mencionan que en aislados ambientales de muestras de suelo la resistencia a penicilinas y algunas cefalosporinas, mediada por sistemas de eflujo es poco frecuente (<5%), por lo que otros mecanismos, como podrían ser enzimas de inactivación, son los responsables de dar cuenta de esta resistencia. Lo anterior es apoyado por análisis de metagenomas de suelo antártico que muestran que genes codificantes para enzimas de inactivación de betalactámicos son comunes (Van Goethem et al., 2018). Considerando lo anterior, es probable que el principal mecanismo de resistencia contra betalactámicos en aislados ambientales de suelo antártico esté dado por betalactamasas que poseen actividad reducida o nula contra los antibióticos betalactámicos probados. Lo anterior no implica la inexistencia de resistencia a betalactámicos mediada por sistemas de eflujo. De hecho, en la cepa multirresistente secuenciada *Pseudomonas* spp. YeP6b destaca la resistencia a cefepima, una cefalosporina resistente a betalactamasas de clase C (Tamma et al., 2013). Los

análisis del resistoma y perfiles HMMs mostraron que YeP6b sólo cuenta con betalactamasas de clase C, además de una posible metalobetalactamasa, la cual podría ser responsable de esta resistencia. No obstante, lo anterior se ve dificultado por un estudio previo que indica que no habría relación entre la resistencia a cefepima y la producción de betalactamasas de clase B en *Pseudomonas aeruginosa* (Kotwal et al., 2016). Resulta posible que esta cefalosporina esté siendo transportada por un sistema de eflujo. No obstante, el único sistema que posee YeP6b, cuya capacidad para transportar betalactámicos ha sido demostrada es MexAB-OprM, el cual comparte con PAMC 27494, cepa que, en cambio, es sensible a este antimicrobiano. Por lo tanto, o existe una alguna diferencia entre estos dos sistemas ya sea en expresión o estructura o la resistencia a cefepima esta mediada por alguno de los otros sistemas de eflujo detectados o por un mecanismo desconocido.

La fosfomicina es un análogo del fosfoenolpiruvato (PEP) y como tal se une a la enzima MurA, inhibiendo los primeros pasos de la síntesis de la pared celular de bacterias tanto Gram positivo como negativo (Zahedi Bialvaei et al., 2018). Debido a su amplio espectro y confiabilidad, durante los últimos 40 años, la fosfomicina ha sido usada en una amplia gama de aplicaciones y campos, siendo una opción valiosa para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Sin embargo, los altos índices de resistencia obtenidos para fosfomicina en la gran mayoría de las zonas muestreadas contrastan con lo reportado en la literatura, en donde para Sudamérica los valores rondan entre un 5% y 10% (Zahedi Bialvaei et al., 2018). Aunque en el estudio mencionado la mayoría de las cepas analizadas fueron aislados clínicos y no muestras ambientales, esta diferencia también puede ser explicada por otras causas. La primera de ellas es debido al método utilizado. En el presente trabajo todos los análisis fueron

hechos por ensayos de difusión de discos probando varios antibióticos en una misma placa y por ende utilizando el mismo medio para todos ellos. Sin embargo, se ha reportado que para el caso de fosfomicina es necesario suplementar el medio con glucosa-6-fosfato y el no hacerlo puede generar falsos positivos en cuanto a fenotipo resistente. Otra explicación posible es el principal mecanismo de resistencia a fosfomicina, una permeabilidad de membrana disminuida. Esto es factible si consideramos que la mayoría de los aislados analizados corresponden a *Pseudomonas* que poseen esta característica. Para corroborar los resultados obtenidos, al menos en parte de los aislados, sería conveniente determinar la concentración mínima inhibitoria para fosfomicina en cada caso.

En cuanto a la colistina, antibiótico que en las pruebas obtuvo el segundo mayor índice de resistencia (33%), estudios previos también reportaron altos índices de resistencia, en donde sobre el 70% de aislados de suelo de muestras de zonas urbanas, agrícolas y prístinas que mostraron fenotipo de multirresistencia (resistencia a 3 o más clases diferentes de antibióticos) fueron capaces de crecer en presencia de dicho antimicrobiano (Walsh & Duffy, 2013). Debido a que la colistina solo actúa sobre bacterias Gram negativo resulta esperable un alto índice de resistencia. Sin embargo, al fijarse solo en las cepas Gram negativo que fueron genotipificadas (el 90% *Pseudomonas*) notamos que alrededor de un 50% de estas son resistentes. Esto llama la atención, ya que en cepas clínicas de *Pseudomonas* la colistina tiene una efectividad considerablemente mayor, siendo usada comúnmente como último recurso contra la infección de patógenos multirresistentes (Zhang et al., 2019). Walsh & Duffy (2013) reportaron discrepancias en la resistencia intrínseca entre aislados ambientales y clínicos, especificando para el caso de colistina que el 83% de la resistencia a este

antibiótico en muestras ambientales es mediada por sistemas de eflujo, a diferencia de aislados clínicos cuyo principal mecanismo de resistencia depende de modificaciones en el LPS. Esto podría explicar al menos en parte la diferencia obtenida en los índices de resistencia entre cepas ambientales y clínicas. Se ha visto que alteraciones en el sistema de regulación de dos componentes PhoP/Q, conlleva a cambios en la expresión del operón *arnBCADTEF*, que codifica enzimas que modifican el lípido A de la membrana externa celular, confiriendo resistencia a colistina (Döselmann et al., 2017). Sin embargo, ni este operón ni otras enzimas de modificación del Lípido A fueron detectadas en la cepa YeP6b, por lo que resulta probable que su resistencia este guiada por una bomba de eflujo. Un posible mediador del fenotipo de resistencia observado en la cepa YeP6b es el sistema de eflujo MexAB-OprM, cuya sobreexpresión aumenta la tolerancia a colistina (Pamp et al., 2008), sin embargo experimentos posteriores sobre la concentración mínima inhibitoria (no mostrados) revelaron una hiperresistencia de la cepa al antibiótico, a concentraciones que incluso inhibieron el crecimiento de cepas Gram positivas intrínsecamente resistentes. Lo anterior sugiere fuertemente que *Pseudomonas* spp. YeP6b posee mecanismos de tolerancia o degradación de colistina que no han sido descritos hasta ahora.

Respecto a los antibióticos con menor índice de resistencia, tigeciclina y meropenem destacan por ser los únicos efectivos contra todas las cepas probadas. Meropenem es un carbapenémico caracterizado por tener una gran resistencia a betalactamasas. Generalmente es usado como último recurso para el tratamiento de infecciones bacterianas multirresistentes. Por otro lado, tigeciclina es el primer miembro de una clase relativamente nueva de antibióticos llamada glicilciclinas. Es un antibiótico bacteriostático que bloquea la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad

30S del ribosoma. Posee un amplio espectro de acción, siendo activa contra la mayoría de patógenos intrahospitalarios. Los mecanismos de resistencia conocidos se basan en protección ribosomales, y en bombas de eflujo que disminuyan la concentración intracelular del antibiótico (Curcio & Istúriz, 2006). Por lo mismo, resulta inesperada la sensibilidad de nuestros aislados a tigeciclina, al considerar la alta proporción de *Pseudomonas* obtenidas. Debido a sus bombas de eflujo codificadas en el cromosoma, normalmente las cepas de *Pseudomonas* son intrínsecamente resistentes a tigeciclina, siendo el sistema MexAB-OprM el principal responsable de conferir dicha resistencia (Curcio & Istúriz, 2006). A pesar de que la *Pseudomonas* secuenciada YeP6b posee este sistema en un mismo número de copias que PA7, nuestra cepa resultó ser sensible al antimicrobiano, siendo otro ejemplo de diferencias en la resistencia intrínseca entre cepas ambientales y clínicas. Esto apoya la idea de la variabilidad en los sistemas de eflujo encontrados en los distintos ambientes, y a su diferencia con lo visto en cepas clínicas. Si existe una diferencia estructural entre ambas bombas, una comparación detallada de la secuencia de las proteínas que conforman el sistema entre ambas cepas podría dilucidar el fenómeno.

Los siguientes antimicrobianos que destacaron por su efectividad fueron amikacina y piperacilina/tazobactam. Amikacina es un aminoglucósido, cuyo principal mecanismo de resistencia conocidos son enzimas de inactivación. Considerando la alta tasa de resistencia a este antibiótico que se ha reportado en otros suelos (Walsh & Duffy, 2013) y que en los análisis de perfiles HMMs se detectaron 7 posibles AACs en la cepa YeP6b, y aun así posee un fenotipo de sensibilidad frente a amikacina, se puede suponer que tal como se teorizó con los betalactámicos las enzimas de inactivación de aminoglucósidos presentes en el suelo antártico, por lo general no son

efectivas contra amikacina. Aunque también es posible que exista un problema de expresión y que las enzimas detectadas no alcancen las concentraciones o actividad necesarias para inactivar al antibiótico. La evaluación de la susceptibilidad contra otros aminoglucósidos puede ayudar a dilucidar esto.

Continuando con el siguiente antibiótico, piperacilina es una penicilina de espectro extendido combinada con el inhibidor de betalactamasas tazobactam. Análisis previos de metagenomas de suelo mostraron que no se encontraron betalactamasas resistentes a inhibidores como tazobactam (Walsh & Duffy, 2013), lo cual se condice con los resultados obtenidos.

Respecto al resto de antibióticos los índices de resistencia varían entre diversos estudios, algunos coinciden (CIP, VA), otros poseen menores índices de resistencia (RD, E) que lo reportado en la literatura y otros simplemente no se encontró bibliografía comparable (DA, LZD, SXT). En todo caso la diferencia vista entre suelos, incluso dentro de este mismo trabajo, muestra la alta variabilidad que existe, dificultando las comparaciones fuera de una misma zona. Se observó que los perfiles de resistencia son propios para cada localidad, y probablemente están influenciadas por las características y composición propias de cada suelo. Sería interesante evaluar la presencia de compuestos antimicrobianos en los distintos suelos buscando una correspondencia con las resistencias detectadas.

Aparentemente, los sistemas de eflujo representan el principal mecanismo responsable de conferir multirresistencia en la cepa YeP6b, los cuales destacan por su versatilidad, funcionando incluso con drogas sintéticas que no se encuentran en el ambiente (Walsh & Duffy, 2013). Resulta conveniente para los microorganismos el desarrollo de un único sistema, como lo son las bombas de eflujo, capaz de lidiar con

múltiples antibióticos sin importar su mecanismo, en vez de sistemas específicos como lo son enzimas de inactivación. Sin embargo, nuestros resultados indican que estos sistemas de eflujo poseen al menos cierto grado de especificidad, lo que daría cuenta de las diferencias en la sensibilidad entre YeP6b y otras cepas de *Pseudomonas* que comparten diversos sistemas de eflujo de las mismas familias. Estudiar la estructura química de los antibióticos que son transportados y de aquellos que no, puede dar pistas de la estructura de estos sistemas y servir para la generación de futuros fármacos que inhiban su funcionamiento. Adicionalmente, el bloqueo de estos sistemas puede servir como blanco para combatir infecciones por cepas de *Pseudomonas* multirresistentes.

Como se esperaba, la mayoría de las cepas multirresistentes aisladas corresponden a *Pseudomonas*. No obstante, resulta interesante que las cepas seleccionadas por ser resistentes a los antibióticos que en las PSA mostraron mayor efectividad (AK y TZP) no lo sean. De estas, cada una pertenece a géneros distintos y poseen una considerable menor multirresistencia (solo resisten entre 1 a 4 antibióticos) que las *Pseudomonas* aisladas. Por lo mismo, resulta probable que para estos aislados la resistencia no dependa de bombas de eflujo, sino de algún mecanismo más específico. Una interesante proyección sería evaluar el origen de estas resistencias, para determinar si esta es intrínseca, fue desarrollada o adquirida por transferencia horizontal.

Durante el ensamblaje de la cepa YeP6b, destacó un contenido GC inferior al de las *Pseudomonas* de referencia PA7 pero similar al del psicrófilo antártico PAMC 27494. Esta diferencia da cuenta de la distancia filogenética entre cepas ambientales y clínicas, incluso dentro de un mismo género. Al anotar el genoma de la cepa YeP6b no

fue posible la asignación funcional del 23,4% de las CDS identificadas, valor cercano a lo observado en el caso de PAMC 27494 (29,0%) y PA7 (27,7%). A pesar de esto, para aproximadamente la mitad (48,5%) de las proteínas de función conocida no fue posible la categorización en algún subsistema. Lo anterior se vio reflejado en un conteo menor de genes para prácticamente todas las categorías listadas. Adicionalmente, no fue posible identificar la especie de la cepa. Lo anterior sumado a la discrepancia entre el perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antimicrobianos de la *Pseudomonas* spp. YeP6b nos demuestra lo mucho que se desconoce y nos sugiere fuertemente la existencia de nuevos mecanismos de resistencia.

En resumen, nuestros resultados apuntan a que en ambientes antárticos prístinos existe un reservorio de genes de resistencia a antibióticos cuyo origen se explicaría por competencia natural de los microorganismos que allí habitan, siendo del género *Pseudomonas* las bacterias multirresistentes cultivables más abundantes en estos suelos, cuya resistencia estaría dada en gran medida por sistemas de eflujo. La incompatibilidad entre el perfil fenotípico y genotípico de resistencia a antimicrobianos de la *Pseudomonas* multirresistente secuenciada junto con la imposibilidad de definir su especie sugieren fuertemente la existencia de nuevos mecanismos de resistencia presentes en el ambiente. El estudio y entendimiento detallado de estos novedosos mecanismos puede aportarnos pistas importantes para el desarrollo de nuevos fármacos, y para anticiparnos a posibles nuevos mecanismos de resistencia que puedan surgir en el futuro entre bacterias de relevancia clínica. Lo anterior evidencia que existe un gran potencial para la bioprospección de recursos microbianos en el contexto de la crisis global de resistencia a antibióticos en ambientes naturales y en particular en la Antártica. Finalmente, las discrepancias entre lo reportado en aislados

clínicos y lo visto en muestras ambientales son prueba de que restringirse a modelos clínicos para estudiar el fenómeno de resistencia a antimicrobianos es insuficiente. Se necesita una mirada holística del problema que se extienda más allá del ser humano e incluya el resistoma presente en el ambiente, y como éste podría transferirse a cepas patógenas. En particular, resulta de especial interés estudiar el resistoma presente en la Península Antártica, la cual mantiene un tránsito constante con Chile, siendo este país la potencial puerta de entrada de información genética proveniente del continente blanco. Lo anterior es especialmente relevante en el contexto de la creciente exposición de nuevos suelos por el derretimiento de los hielos causado por el calentamiento global, lo que amplía y diversifica el resistoma ambiental.

6. SÍNTESIS Y CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se evaluó la susceptibilidad a antibióticos de aislados de muestras de suelo antártico, observándose una alta incidencia de resistencia para una amplia gama de antimicrobianos. Lo anterior fue observado tanto para muestras provenientes de zonas humanizadas como zonas prístinas, aunque las cepas aisladas de sitios prístinos destacaron por poseer mayor multirresistencia.
2. Nuestros resultados sugieren que las actividades humanas no tendrían mayor influencia en la presencia de bacterias resistentes en las muestras de suelo analizadas.
3. La identificación taxonómica de los aislados mostró que en las muestras de suelo antártico analizadas, *Pseudomonas* corresponde al género multirresistente cultivable más abundante.
4. Mediante la combinación de las tecnologías de secuenciación Nanopore (MinION) e Illumina, se logró el ensamblaje completo del genoma de la cepa *Pseudomonas* spp. YeP6b la cual corresponde al aislado con mayor multirresistencia y procede de un sitio prístino.
5. Los análisis genómicos indicaron que el fenotipo de multiresistencia de *Pseudomonas* spp. YeP6b estaría dado al menos en parte por la presencia de múltiples sistemas de eflujo. No obstante, la baja proporción de genes conocidos de resistencia sugiere la existencia de nuevos mecanismos que no se encuentran representados en las bases de datos utilizadas para la identificación.

6. El alto porcentaje de genes sin función conocida de la cepa YeP6b y la limitada identidad entre las proteínas de esta cepa y otras cepas conocidas del mismo género, dan cuenta del reservorio genético microbiano único existente en la Antártica, el cual posee un alto potencial para la Bioprospección.

7. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de la existencia de un reservorio natural de genes AMR en el ambiente.

7. FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto INACH (RT_51-16) dirigido por el Dr. Andrés Marcoleta y por el proyecto 1000 genomas: Chile secuencia a Chile a cargo del Dr. Miguel Allende.

8. REFERENCIAS

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Beek, M. v., Bouvier, D., Čech, M., . . . Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544.
- Altschul, S. F. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, *25*(17), 3389–3402.
- Anderson, L. (2016). *Antibiotics Guide*. Recuperado el 20 de Mayo de 2019, de <https://www.drugs.com/article/antibiotics.html>
- Andrews, S. (2018). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Obtenido de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Axelsen, P. H. (2008). A Chaotic Pore Model of Polypeptide Antibiotic Action. *Biophys J.*, *94*(5), 1549–1550.
- Beattie, A., Hay, M., Magnusson, B., de Nys, R., Smeathers, J., & Vincent, J. (2011). Ecology and bioprospecting. *Austral Ecology*, *36*(3), 341–356.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120.
- Brettin, T., Davis, J., Disz, T., Edwards, R., Gerdes, S., Olsen, G., . . . Pusch, G. (2015). RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*, *5*(8365), 8365.
- Bruce, A. (2014). *Molecular biology of the cell* (Sixth ed.). New York: Garland Science.
- Brugueras, M. C., & García, M. M. (1999). Antibacterianos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Rev Cubana Med*, *15*(2), 156-167.
- Canepari, P., & Boaretti, M. (1996). Lipoteichoic acid as a target for antimicrobial action. *Microb Drug Resist*, *2*(1), 85-9. Recuperado el 21 de Mayo de 2019, de <https://www.vademecum.es/principios-activos-daptomicina-j01xx09>
- Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., & Cowan, D. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies. *Trends Microbiol.*, *18*(8), 374-81.
- CDC, (Centers for Disease Control and Prevention). (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. *U.S Department of Health and Human Services*.
- Connell, S. R., Tracz, D. M., Nierhaus, K. H., & Taylor, D. E. (2003). Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, *47*(12), 3675–3681.
- Curcio, D. J., & Istúriz, R. E. (2006). Tigeciclina, la primera gliciliciclina. *Rev Panm Infectol*, *8*(3), 35-42.
- D'Costa, V., McGrann, K., Hughes, D., & Wright, G. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science*, *311*(5759), 374-7.
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D., Cruets, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, *34*(15), 2666-2669.
- de Pascale, D., De Santi, C., Fu, J., & Landfald, B. (2012). The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Mar Genomics*, *8*(1), 15-22.
- Döbelmann, B., Willmann, M., Steglich, M., Bunk, B., Nübel, U., Peter, S., & Neher, R. A. (2017). Rapid and Consistent Evolution of Colistin Resistance in Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* during Morbidostat Culture. *American Society for Microbiology*, *61*(9), e00043-17.
- Eddy, S. (1996). Hidden Markov Models. *Current Opinion in Structural Biology*, *6*(3), 361-365.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLOS Comp. Biol.*, *7*(10), e1002195.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S., Luciani, A., Potter, S., . . . Finn, R. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427-D432.

- Garrigues, F. (2017). *GENÉTICA MÉDICA BLOG*. Recuperado el 16 de Julio de 2019, de <https://revistageneticamedica.com/blog/ngs-secuenciacion/>
- Garrigues, F. (2017). *Genotipia*. Recuperado el 16 de Julio de 2019, de <https://genotipia.com/la-era-de-la-genomica/>
- Gibson, M., Forsberg, K., & Dantas, G. (2014). Improved annotation of antibiotic resistance functions reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME Journal*, 9(1), 207-16.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., & García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front Microbiol.*, 6(1), 214.
- González-Rocha, G., Muñoz-Cartes, G., Canales-Aguirre, C. B., Lima, C. A., Domínguez-Yévenes, M., Bello-Toledo, H., & Hernández, C. E. (2017). Diversity structure of culturable bacteria isolated from the Fildes Peninsula (King George Island, Antarctica): A phylogenetic analysis perspective. *PLoS One*, 12(6), e0179390.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Hardin, J., & Bertoni, G. P. (2016). *Becker's World of the Cell* (9th ed.). Pearson.
- Hilal-Dandan, R., & Brunton, L. L. (2015). *Goodman & Gilman. Manual de farmacología y terapéutica* (2 ed.). McGraw-Hill Education.
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., & Tsang, P. G. (2016). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D566–D573.
- Jolley, K., & Maiden, M. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 595.
- Jolley, K., & Maiden, M. (2014). Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol*, 9(5), 623-30.
- Jolley, K., Bliss, C., Bennett, J., Bratcher, H., Brehony, C., Colles, F., . . . Maiden, M. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*, 158(4), 1005-15.
- Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS.*, 118(1), 1-36.
- Kotwal, A., Biswas, D., Kakati, B., & Singh, M. (2016). ESBL and MBL in Cefepime Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: An Update from a Rural Area in Northern India. *J Clin Diagn Res*, 10(4), DC09–DC11.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A., Wertheim, H., Sumpradit, N., . . . Hara, G. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, 13(12), 1057-98.
- Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J., Klugman, K., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *Lancet.*, 9;387(10014), 168-75.
- Idred, K., Kerns, R., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574.
- Lee, J., Cho, Y.-J., Yang, J. Y., Jung, Y.-J., Hong, S. G., & Kim, O.-S. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas antarctica* PAMC 27494, a bacteriocin-producing psychrophile isolated from Antarctica. *Short Genome Communications*, 259(1), 15-18.
- Lindner, K. R., Bonner, D. P., & Koster, W. H. (2000). Monobactams. En *Kirk-Othmer - Encyclopedia of Chemical Technology*. (5 ed.).
- López, C. A., Travers, T., Pos, K. M., Zgurskaya, H. I., & Gnanakaran, S. (2017). Dynamics of Intact MexAB-OprM Efflux Pump: Focusing on the MexA-OprM Interface. *Scientific Reports*, 7(1), 16521.
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2013). *Brock. Biología de los microorganismos* (14ª ed.). UK: Pearson.
- Mathews, C. K., Holde, K. E., & Ahern, K. G. (1999). *Biochemistry* (3rd ed.). Pearson.

- Moore, D. (2019). *Antibiotic Classification & Mechanism*. Recuperado el 20 de Mayo de 2019, de <https://www.orthobullets.com/basic-science/9059/antibiotic-classification-and-mechanism>
- Motulsky, H. J. (2016). *GraphPad Statistics Guide*. Recuperado el 22 de Septiembre de 2019, de <http://www.graphpad.com/guides/prism/8/statistics/index.htm>
- Newman, D., & Cragg, G. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.*, 79(3), 629-61.
- OpenStreetMap. (s.f.). [Mapa de la península antártica] Recuperado el 3 de Octubre de 2019, de <https://www.openstreetmap.org/#map=6/-63.030/-59.150>
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R., Choudhuri, J., Chuang, H.-Y., Cohoon, M., . . . Edwards, R. (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.*, 33(17), 5691-5702.
- Oxford Nanopore Technologies. (s.f.). Recuperado el 16 de Julio de 2019, de <https://nanoporetech.com/products/minion>
- Pamp, S. J., Gjermansen, M., Johansen, H. K., & Tolker-Nielsen, T. (2008). Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes. *Mol Microbiol.*, 68(1), 223-40.
- Panasevich, C. (2004). New Antibiotics Needed as Drug Resistance Continues to Grow. *Nations Health*, 34(7), 1-9.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192.
- Parks, D., Imelfort, M., Skennerton, C., Hugenholz, P., & Tyson, G. (2014). Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043-1055.
- Paul, E., & Clark, F. (2007). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (3rd ed.). Elsevier Inc.
- Perry, J., Westman, E., & Wright, G. (2014). The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol.*, 21(1), 45-50.
- Pigrau, C. (2003). Oxazolidinonas y glucopéptidos. *Enferm Infec Microbiol Clin.*, 21(3), 157-65.
- RingBio. (s.f.). *Beta lactams antibiotics: The greatest discovery, the biggest danger*. Recuperado el 21 de Mayo de 2019, de <https://ringbio.com/es/node/183>
- Roy, P., Tetu, S., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., . . . Paulsen, I. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One.*, 5(1), e8842.
- Smith, R. A., M'ikanatha, N. M., & Read, A. F. (2015). Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action. *Health Commun*, 30(3), 309-314.
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M., & Nikaido, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16220-16229.
- Tamma, P. D., Girdwood, S. C., Gopaul, R., Tekle, T., Roberts, A. A., Harris, A. D., . . . Carroll, K. C. (2013). The Use of Cefepime for Treating AmpC β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 57(6), 781-788.
- Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol.*, 330(5), 1005-14.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. (Enero de 2017). *EUCAST Disk Diffusion Test Methodology*. Obtenido de www.eucast.org
- Tindall, B. (2004). Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microb Ecol.*, 47(3), 271-83.
- Van Goethem, M. W., Pierneef, R., Bezuidt, O. K., Peer, Y. V., Cowan, D. A., & Makhalanyane, T. P. (2018). A reservoir of 'historical' antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils. *Microbiome*, 6(1), 40.

- Wallace, J. C., Port, J. A., Smith, M. N., & Faustman, E. M. (2017). FARME DB: a functional antibiotic resistance element database. *Database (Oxford)*, 2017: baw165.
- Walsh, F., & Duffy, B. (2013). The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLoS ONE*, 8(6), e65567.
- Wang, C.-M., Zhang, L., Meng, Q.-G., Zhao, F.-L., & Chai, X.-Y. (2017). Synthesis and Antibacterial Evaluation of a Series of 11,12-Cyclic Carbonate Azithromycin-3-O-descladinosyl-3-O-carbamoyl Glycosyl Derivatives. *Molecules*, 22(12), 2146.
- Wattam, A. R., Davis, J. J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., & Bun, C. (2016). Improvements to PATRIC, the all-bacterial bioinformatics database and analysis resource center. *Nucleic Acids Res.*, 45(D1), D535–D542.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput. Biol.*, 13(6), e1005595.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., Brinkman, & S, F. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.*, 4(D1), D646-53.
- Wolfson, J., & Hooper, D. (1985). The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.*, 28(4), 581–586.
- Zahedi Bialvaei, A., Abbasian, S., Kouhsari, E., Mansour, S., Mohammadzadeh, N., & Ghafouri, Z. (2018). Fosfomycin: mechanisms and the increasing prevalence of resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 68(1), 11-25.
- Zhang, H., Hou, M., Xu, Y., Srinivas, S., Huang, M., Liu, L., & Feng, Y. (2019). Action and mechanism of the colistin resistance enzyme MCR-4. *Communications Biology*, 2(1), 36.

9. ANEXOS

Anexo I: Resumen de las familias de antibióticos.

Blanco	Clasificación		Antibióticos	
Pared Celular	Betalactámicos	Inhibidores de betalactamasas	Sulbactam, Ácido Clavulánico, Tazobactam, Avibactam	
		Penicilinas	<i>Sensibles a Penicilinasas</i>	
			Amino penicilinas	Ampicilina, Amoxicilina
			Naturales	Penicilina G, Penicilina VK
			<i>Resistentes a penicilinasas</i>	
			Nafcilina, Oxacilina, Dicloxacilina	
			<i>Antipseudo-monadales</i>	
			Carboxipenicilinas	Tircacilina, Carbenicilina
			Ureidopenicilinas	Piperacilina, Azlocilina, Mezlocilina
		Cefalosporinas	1° Generación	Cefalexina, Cefazolina, Cefadroxilo, Cefadrina
			2° Generación	Cefuroxima, Cefprozil, Cefaclor, Cefoxitina, Cefotetan, Loracarbef
	3° Generación		Cefoperazona, Ceftriaxona, Cefixima, Cefpodoxima, Ceftizoxima, Cefotaxima, Cefdinir, Ceftibuteno, Ceftazidima, Cefditoreno	
	4° Generación		Cefepima, Cefpiroma	
	5° Generación		Ceftarolina, Ceftolozano	
Carbapenemas		Meropenem, Ertapenem, Doripenem, Imipenem		
Monobactámicos		Aztreonam		
No lactámicos	Glucopéptidos		Vancomicina, Telavancina, Dalbavancina, Oritavancina	
	Fosfomicina			
Membrana Celular	Polipéptido		Colistina, Polimixina B	
	Lipopéptido		Daptomicina	
Ribosoma	30S	Aminoglucósidos	Amikacina, Gentamicina, Tobramicina, Estreptomicina, Neomicina	
		Tetraciclinas	Doxiciclina, Minociclina, Tigeciclina, Tetraciclina	
	50S	Oxazolidinonas	Linezolid, Tidezolid	
		Estreptograminas	Quinupristina/Dalfopristina	
		Cloranfenicol		
		Macrolides	Eritromicina, Azitromicina, Claritromicina	
Lincosamides	Clindamicina, Lincomicina			
DNA topoisomerasas	Quinolonas		Ácido nalixidico	
	Fluoroquinolonas		Ciprofloxacino, Moxifloxacino, Levofloxacino, Gemifloxacino, Norfloxacino, Oxfloxacino	
Síntesis de ácido fólico	Sulfonamidas		Sulfametoxazol, Ag Sulfadiazina, Sulfasalazina, Sulfisoxazol	
	Inhibidores DHFR		Trimetroprima, Pirimetamina	
DNA	Nitroimidazoles		Metronidazol, Tinidazol	
Síntesis mRNA			Rifampicina	

Anexo II: Antibióticos utilizados en este trabajo junto a una breve descripción de su mecanismo.

Antibiótico	Código	µg	Familia o clase	Espectro	Mecanismo de acción
Amikacina	AK	30	Aminoglucósidos	Amplio espectro	Adhiere de manera irreversible al rRNA 16S y la proteína S12 de la subunidad 30S en el ribosoma procarriótico. Inhibe la síntesis de proteínas por cambiar la conformación del ribosoma. También interfiere con la región que interacciona con el par base inestable del anticodón de tRNA.
Ciprofloxacino	CIP	5	Fluoroquinolonas	Amplio espectro	Inhibe la división celular paralizándolo la replicación del DNA al unirse y bloquear la enzima DNA girasa.
Ceftarolina	CPT	5	Cefalosporina	Amplio espectro	Interfiere en la síntesis de peptidoglicano de la pared celular bacteriana e inhibe la transpeptidación final, necesaria para la reticulación.
Colistina	CT	10	Polipéptidos	Bacilos Gram negativos	Interactúan con la membrana citoplasmática bacteriana, cambiando su permeabilidad.
Clindamicina	DA	2	Lincosamidas	Cocos Gram positivos aerobios y Bacilos Gram negativos anaerobios	Interfiere con la síntesis de las proteínas, uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.
Eritromicina	E	15	Macrólidos	Cocos Gram positivos	Inhibe la síntesis de proteínas en la bacteria al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.
Cefepima	FEP	30	Cefalosporina	Amplio espectro	Inhibe la división celular paralizándolo la replicación del DNA al unirse y bloquear la enzima DNA girasa.
Fosfomicina/ Trometamol	FOT	200	Otros	Amplio espectro	Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana
Linezolid	LZD	30	Oxazolidinonas	Cocos Gram positivos	Inhibe la síntesis proteica al fijarse al sitio P (23S) de la subunidad ribosomal 50S evitando la formación del complejo de iniciación.
Meropenem	MEM	10	Carbapenemas	Amplio espectro	Antibiótico betalactámico, Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana.
Rifampicina	RD	5	Contra micobacteria	Gram positivos y algunas Gram negativas	Se une a la subunidad β de la RNA polimerasa (rpoB). El complejo suprime la síntesis de RNA.
Trimetoprima- Sulfametoxazol	SXT	25	Sulfonamida + inhibidor DHFR	Gram positivos (estafilococos, estreptococos)	Bacteriostáticos. Ambos actúan sobre la ruta de síntesis del tetrahidrofolato, cuya inhibición provoca finalmente que las bacterias afectadas no puedan sintetizar purinas.
Tigeciclina	TGC	15	Gliciliclinas	Amplio espectro	Inhibe la síntesis proteica por unión a la subunidad del ribosoma bacteriano 30S, bacteriostático
Piperacilina/ Tazobactam	TZP	110	Penicilina + inhibidor de betalactamasa	Gram positivas y Gram negativas	Contiene el antibiótico B-lactámico piperacilin y el inhibidor de B-lactamasas Tazobactam. Inhibe la síntesis de pared celular.
Vancomicina	VA	30	Glucopéptido	Gram positivas	Bactericida. Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana al alterar la acción de la transglucosidasa por impedimento estérico.

Anexo III: Perfiles HMMs asociados a AMR identificados en la cepa YeP6b usando la base de datos Resfams.

<i>Accession</i>	<i>Count</i>	<i>HMM description</i>
RF0003	1	Aminoglycoside Acetyltransferase (AAC3-I) [ARO:3001205]
RF0004	1	Aminoglycoside Acetyltransferase (AAC6-I) [ARO:3001207]
RF0007	1	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump [ARO:0010001]
RF0008	4	ABC transporter
RF0011	1	Acetyltransferase (GNAT) family
RF0012	1	Acetyltransferase (GNAT) domain
RF0013	1	Acetyltransferase (GNAT) domain
RF0014	1	Acetyltransferase (GNAT) domain
RF0016	1	Acetyltransferase (GNAT) domain
RF0022	1	adeR: positive regulator of AdeABC efflux system [ARO:3000553]
RF0023	1	adeS: gene modulating antibiotic efflux regulating AdeABC [ARO:3000549]
RF0024	7	Aminotransferase class I and II
RF0032	3	Phosphotransferase enzyme family
RF0035	1	baeR: subunit of gene modulating antibiotic efflux [ARO:3000828]
RF0036	1	baeS: subunit of gene modulating antibiotic efflux [ARO:3000829]
RF0038	1	Beta-lactamase
RF0051	2	chloramphenicol efflux pump [ARO:3001212]
RF0052	1	chloramphenicol phosphotransferase (CPT) [ARO:3000249]
RF0055	3	Class C beta-lactamases [ARO:3000076;ARO:3000019]
RF0057	4	A grouping of the related CMY, LAT, MOX, ACT, MIR, and FOX beta-lactamases (class c) [ARO:3000072;ARO:3000058;ARO:3000067;ARO:3000084;ARO:3000069;ARO:3000083]
RF0058	5	Chloramphenicol phosphotransferase-like protein
RF0062	1	DHA beta-lactamase (class c) [ARO:3000068]
RF0065	2	emrB: subunit of efflux pump conferring antibiotic resistance [ARO:3000074]
RF0066	2	emrE: small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump [ARO:3000264]
RF0079	8	Bacterial regulatory helix-turn-helix proteins, AraC family
RF0085	2	Metallo-beta-lactamase superfamily
RF0089	1	macB: subunit of efflux pump conferring antibiotic resistance [ARO:3000535]
RF0092	1	MarR family
RF0095	2	PF12847.2 Methyltransferase domain [ARO:3000000]
RF0102	1	Major Facilitator Superfamily
RF0103	10	Transmembrane secretion effector
RF0104	7	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump [ARO:0010002]
RF0107	1	msbA: ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump [ARO:3000460]
RF0109	1	norA: major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump [ARO:3000391]
RF0112	2	phoQ: subunit of gene modulating antibiotic efflux [ARO:3000835]
RF0113	1	(Qnr): antibiotic target protection protein ARO:3000419
RF0127	1	tetA: tetracycline resistance MFS efflux pump [ARO:3000165]
RF0134	2	tetracycline resistance MFS efflux pump: selectively pump out tetracycline or tetracycline derivatives [ARO:3000239]
RF0140	2	TIGR00710 efflux Bcr CflA: drug resistance transporter, Bcr/CflA subfamily [ARO:3000000]
RF0141	1	TIGR00711 efflux EmrB: drug resistance MFS transporter, drug:H+ antiporter-2 (14 Spanner) (DHA2) family [ARO:3000074]
RF0143	1	TIGR01188 drrA: daunorubicin resistance ABC transporter, ATP-binding protein [ARO:3000000]
RF0154	10	VanR: transcriptional activator regulating VanA, VanH and VanX [ARO:3000574]
RF0155	10	VanS: transcriptional regulator of van glycopeptide resistance genes [ARO:3000071]