



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

“Resistencia a antibióticos en *Piscirickettsia salmonis* y en comunidades bacterianas marinas obtenidas desde zonas expuestas y no expuestas a antibióticos utilizados en salmonicultura”

Tesis entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas.

Facultad de Ciencias

CAMILA JOSÉ STUARDO OLIVARES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. VERÓNICA CAMBIAZO

CODIRECTORA DE TESIS: DRA. JAVIERA ORTIZ SEVERÍN

Diciembre 2021

Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que la Tesis de Magíster presentada por la candidata **Camila José Stuardo Olivares**.

“Resistencia a antibióticos en *Piscirickettsia salmonis* y en comunidades bacterianas marinas obtenidas desde zonas expuestas y no expuestas a antibióticos utilizados en salmonicultura”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de septiembre de 2021.

Directora de Tesis:

Dra. Verónica Cambiazo

Codirectora de Tesis:

Dra. Javiera Ortiz-Severín

Comisión de evaluación

Dr. Francisco Chávez

Presidente de la comisión

Dra. Julieta Orlando

Evaluador

Santiago de Chile, 2021

I. BIOGRAFÍA

Mi nombre es Camila José Stuardo Olivares, pero me conocen como “Chiqui”, nací el 14 de abril de 1992 y soy la hermana mayor de Martin, ambos hijos de Margarita y Andreas. Desde pequeña demostré ser curiosa y amor por la naturaleza y la vida, todo eso convergió a elegir ser científica.



Entré a la Universidad de Chile el año 2012 a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias. Durante esta etapa conocí a grandes amigos y formadores. Desde segundo año de universidad comencé a realizar unidades de investigación en distintos laboratorios que me permitieron colaborar en proyectos de diversas áreas de la biología y adquirir el manejo de diversas técnicas de microbiología y biología molecular. Mientras realizaba mi tesis de pregrado en el laboratorio de Ecología Microbiana de Ambientes Extremos de la Dra. Beatriz Díez (PUC) fue que me fasciné por la ecología microbiana y la genómica, en particular, de ambientes marinos. Desde entonces he dedicado mi trabajo de investigación a esta área, buscando especializarme en esto investigando fenómenos como la transferencia horizontal de genes y la resistencia antimicrobiana en comunidades microbianas marinas.

Mientras realizaba este trabajo de tesis de magíster aconteció un estallido social (Octubre 2019) y una pandemia (Marzo 2020 al presente).

Siempre me encontrarás buscando poner la ciencia al servicio de la sociedad.

II. AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica (LBEG) del Instituto de Nutrición y Tecnología en Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile. En particular, a mis tutoras Verónica Cambiazo por su confianza y apoyo, y a Javiera Ortiz, mi formadora en la microbiología y amiga.

A mi familia, a Diego, a mis roomies y a todos mis amigos. Por el apoyo constante e incondicional.

Gracias infinitas a todos, jamás me alcanzarán las palabras para demostrarles lo importantes que fueron en este proceso, y en mi vida.

Le dedico este trabajo a mi abuelo, José Stuardo, quien falleció el 30 de marzo de 2021 producto de las consecuencias de haber contraído COVID-19, pero que dedicó gran parte de su vida a la oceanografía y el estudio del mar, espero poder seguir su legado.

III. ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CMI	Concentración mínima inhibitoria
cols	colaboradores
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EGM	Elementos genéticos móviles
GRA	Genes de resistencia a antibióticos
HGT	Transferencia horizontal de genes
HMM	Modelo oculto de Markov (<i>hidden Markov model</i>)
Kb	Kilobase
M	Molar
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio

TE	Buffer Tris-EDTA
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

IV. ÍNDICE

I.	BIOGRAFÍA	ii
II.	AGRADECIMIENTOS	iii
III.	ABREVIATURAS	iv
IV.	ÍNDICE.....	vi
V.	ÍNDICE DE FIGURAS	ix
VI.	ÍNDICE DE TABLAS	x
VII.	RESUMEN.....	xii
VIII.	ABSTRACT	xiii
IX.	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 La industria salmonera en Chile y el uso de antibióticos.....	1
	1.2 <i>Piscirickettsia salmonis</i> su susceptibilidad a antibióticos.	3
	1.3 Antibióticos y genes de resistencia a antibióticos (GRA) asociados a su administración en salmonicultura y su impacto en las comunidades microbianas marinas.	8
	1.4. Hipótesis	12
	1.5. Objetivo general	12
	1.6. Objetivos específicos.....	12
X.	2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
	2.1 Objetivo específico 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de <i>P. salmonis</i> a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.....	14
	2.1.1. Cultivo de <i>P. salmonis</i>	14
	2.1.2 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante ensayos con sensidiscos en 12 cepas de <i>P.salmonis</i>	14
	2.1.3. Determinación de concentración mínima inhibitoria en 4 cepas de <i>P. salmonis</i>	16
	2.1.4 Búsqueda e identificación de GRA en 4 cepas de <i>P. salmonis</i>	17
	2.2 Objetivo 2: Identificar <i>in silico</i> GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.	19
	2.2.1 Toma de muestras	19

	2.2.2 Obtención de la biomasa de las muestras de agua de mar	20
	2.2.3. Extracción de ADN total	20
	2.2.4 Visualización y cuantificación de ADN total	22
	2.2.5 Reacción de polimerasa en cadena y amplificación del gen ARNr 16S ...	22
	2.2.6 Secuenciación de ADN total de la comunidad microbiana.....	22
	2.2.7 Filtrado y control de calidad de las secuencias.....	23
	2.2.8 Ensamble, predicción de proteínas y genes de la comunidad microbiana	23
	2.2.9 Identificación de GRA.....	24
	2.2.10 Abundancia relativa de genes GRA en los metagenomas	25
	2.2.11 Asignación taxonómica y abundancia relativa de <i>contigs</i> que contienen GRA.	26
	2.2.12 Construcción de gráficos de genes de GRA y taxonomía de los contigs que los contienen.	26
XI.	3. RESULTADOS.....	27
	3.1. Objetivo 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de <i>P. salmonis</i> a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.	27
	3.1.1 Búsqueda e identificación de genes de resistencia a antibióticos (GRA) en genomas de 4 cepas de <i>P. salmonis</i>	27
	3.1.2 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante la utilización de sensidiscos en 12 cepas de <i>P. salmonis</i>	31
	3.1.3 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 cepas de <i>P. salmonis</i>	34
	3.2: Objetivo 2: Identificar <i>in silico</i> GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.	36
	3.2.1 Extracción y cuantificación del ADN extraído.....	36
	3.2.2 Datos de secuenciación de ADN total de la comunidad microbiana. Filtrado y control de calidad de las secuencias.....	37
	3.2.3 Ensamble, predicción de proteínas y genes de la comunidad microbiana	38
	3.2.4 Identificación de GRA (Genes de Resistencia a Antibióticos) en metagenomas.	39
	3.2.5 Abundancia relativa de genes GRA en los metagenomas	42
	3.2.6 Asignación taxonómica y abundancia relativa de <i>contigs</i> que contienen GRA.	43
XII.	4. DISCUSIÓN	47

4.1. Objetivo 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de <i>P. salmonis</i> a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.	48
4.2: Objetivo 2: Identificar <i>in silico</i> GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.	51
XIII. 5. CONCLUSIONES.....	55
XIV. 6. BIBLIOGRAFÍA	57

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proporción de uso de antibióticos en salmonicultura en Chile entre 2005 y 2016. Página 5

Figura 2: Ubicación de las muestras tomadas en la isla de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Página 22

Figura 3: Genes de resistencia a antibióticos (GRA) identificados en cuatro cepas de *P. salmonis*. Página 32

Figura 4: Sensibilidad a los antibióticos utilizados en salmonicultura. Página 34

Figura 5: Ensayo de determinación de CMI (concentración mínima inhibitoria). Página 37

Figura 6: Integridad de ADN total extraído de la fracción bacteriana a partir de filtros Sterivex. Página 39

Figura 7: Diagrama de flujo del proceso de filtrado, ensamble y predicción de genes y proteínas. Página 41

Figura 8: Genes de resistencia a antibióticos (GRA) identificados por SARGFAM y RGI en los metagenomas de Puñihuil y Quetén. Página 44

Figura 9: Taxonomía a nivel de Filo obtenido para la comunidad total y aquellos contigs que contenían GRA identificados por SARGFAM y RGI. Página 47

Figura 10. Taxonomía a nivel de Orden obtenido para la comunidad total y aquellos contigs que contenían GRA identificados por SARGFAM y RGI. Página 48

VI. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Antibióticos autorizados para su uso en salmonicultura y sus respectivos mecanismos de acción. Página 4

Tabla 2: Resumen de estudios realizados para estudiar el fenotipo de resistencia de *P. salmonis*. Página 10

Tabla 3: Cepas de *P. salmonis* disponibles en el laboratorio de bioinformática y expresión génica del INTA (Instituto de nutrición y tecnología en alimentos) de la Universidad de Chile. Página 17-18

Tabla 4: Rango de concentraciones de antibióticos utilizados para la prueba de concentración mínima inhibitoria en cepas de *P. salmonis*. Página 19

Tabla 5: GRA identificados mediante dos estrategias para cuatro cepas de *P. salmonis*. Página 30

Tabla 6: GRA identificados mediante SARGFAM para cuatro cepas de *P. salmonis*. Página 30.

Tabla 7: GRA identificados mediante RGI para cuatro cepas de *P. salmonis*. Página 31.

Tabla 8: GRA identificados en alguna de las cepas de *P. salmonis* relacionados con antibióticos o familias de antibióticos autorizados para su uso en salmonicultura. Página 33.

Tabla 9: Ensayo de inhibición de crecimiento en 12 cepas de *P. salmonis*. Página 35.

Tabla 10: Rangos de CMI (Concentración mínima inhibitoria) obtenidos para cinco antibióticos de uso en salmonicultura. Página 37

**Tabla 11: Cuantificación por Qubit de las muestras de ADN total del sitio no expuesto a antibióticos (Puñihuil) y del sitio expuesto a antibióticos (Quetén).
Página 39.**

Tabla 12: GRA identificados en los metagenomas agrupados por familias de antibióticos a los que confieren resistencia. Página 43.

Tabla 13: Número de *contigs* asignados taxonómicamente en los niveles de filo y orden. Página 46.

VII. RESUMEN

Chile es el segundo productor de salmónidos a nivel global. Las enfermedades de los salmónidos causan grandes pérdidas económicas y se ven potenciadas por las condiciones de cultivo. Como consecuencia de ello, la industria salmonera administra antibióticos para combatir las enfermedades infecciosas que los afectan. En el año 2018 se administraron más de 320 toneladas de antibióticos en las salmoniculturas distribuidas en territorio nacional. La mayoría de estos tratamientos tienen por objetivo combatir los brotes de *Piscirickettsia salmonis*, y para ello, se utilizan principalmente florfenicol, oxitetraciclina y flumequina. Está descrito que los ambientes naturales como los suelos y el mar son reservorios de genes que otorgan resistencia a antibióticos (GRA), y que la aplicación exógena de estos provoca una selección de bacterias resistentes. En este trabajo se estudió el fenotipo y genotipo de resistencia en 4 cepas de *P. salmonis*, que a pesar de contener diversos GRA en sus genomas no presentaron fenotipo resistente a los antibióticos utilizados en salmonicultura. Por otro lado, se identificó el resistoma de la comunidad microbiana de agua superficial de mar en una zona expuesta a antibióticos y una zona no expuesta a antibióticos de Chiloé, X región, Chile. En cuanto a la diversidad de genes identificados en ambas muestras, estas presentaron en su mayoría elementos comunes entre sí, sin embargo, al analizar la abundancia de estos, en la zona expuesta a antibióticos se identificó mayor abundancia de aquellos genes que otorgan resistencia a los antibióticos utilizados en salmonicultura con respecto a aquella zona no expuesta. En cuanto a la aproximación taxonómica, las comunidades tienen distinto perfil taxonómico y este se mantiene al analizar los miembros de la comunidad que contienen GRA.

VIII. ABSTRACT

Chile is the second largest producer of salmonids globally. Salmonid diseases cause great economic losses and are enhanced by farming conditions. Consequently, the salmon industry administers antibiotics to combat infectious diseases. In 2018, more than 320 tons of antibiotics were administered in salmon farms distributed in the national territory. Most of these treatments are aimed at combating *Piscirickettsia salmonis* outbreaks, and for this, florfenicol, oxytetracycline and flumequine are mainly used. It has been described that natural environment such as soils and the sea are reservoirs of antibiotic resistance genes (ARG), and that the exogenous application of antibiotics causes a selection of resistant bacteria. In this work, the resistance phenotype and genotype were studied in 4 strains of *P. salmonis*, which despite containing various ARG in their genomes, did not present a resistant phenotype to the antibiotics used in salmon farming. On the other hand, the resistome of the microbial community of sea surface water was identified in an area exposed to antibiotics and an area not exposed to antibiotics in Chiloé, X region, Chile. Regarding the diversity of genes identified in both samples, they presented mostly common elements among themselves, however, when analyzing the abundance of these, in the area exposed to antibiotics, a greater abundance of genes that grant resistance to the antibiotics used in the salmon industry with respect to an area unexposed to antibiotics. Regarding the taxonomic approach, the communities present different taxonomic profiles at a community level and also when analyzing the members of the community that contain ARG.

IX. INTRODUCCIÓN

1.1 La industria salmonera en Chile y el uso de antibióticos.

La industria salmonera ha experimentado un rápido desarrollo, convirtiendo a Chile en el segundo productor mundial de salmón y el quinto mayor productor de peces de cultivo del mundo (FAO, 2020), la cosecha total de salmónidos registrada el año 2020 fue de 1.075.896 toneladas (SERNAPESCA, 2020). Este crecimiento y posicionamiento se ha conseguido mediante el cultivo intensivo de peces (Quesada y cols., 2013). Las condiciones de cultivo y factores tales como la manipulación, vacunación y hacinamiento, tienen efectos sobre la fisiología de los peces, afectando su crecimiento y aumentando sus niveles de estrés (Poppe y cols., 2002; Hanstein, 2014). Como consecuencia de esto, aumenta la susceptibilidad a enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y parásitos (Angulo y cols., 2009; Quesada y cols., 2013). Ello ha potenciado el uso de compuestos antimicrobianos para combatir este tipo de enfermedades (Miranda, 2012). En el caso del salmón del atlántico, el año 2020, el 24,4% de las muertes fueron causadas por enfermedades infecciosas, mientras que en trucha arcoíris la mortalidad por enfermedades infecciosas alcanzó un 15,9 % y en salmón Coho un 14,8% (SERNAPESCA, 2020).

En el año 2020 se administraron 379,6 toneladas de compuestos antimicrobianos; el 97,56 % de ellos fue administrado durante la fase de crecimiento en agua de mar. Este porcentaje se subdivide en los siguientes compuestos: 98,63% Florfenicol, 0,83% Oxitetraciclina y 0,53% a Tiamulina y 0,02% a Tilmicosina, estos dos últimos

corresponden a antibióticos no reportados anteriormente (SERNAPESCA, 2020). Los otros cuatro antibióticos autorizados para uso veterinario corresponden a: amoxicilina, eritromicina, ácido oxolínico y flumequina (SERNAPESCA, 2019). Los mecanismos de acción de estos compuestos se presentan en la Tabla 1; los antibióticos mayormente utilizados, florfenicol y oxitetraciclina, ambos se relacionan con la inhibición de la síntesis de proteínas. Las, yas proporciones de uso documentadas entre 2005 y 2016 se muestran en la Figura 1, obtenida de la revisión bibliográfica de Miranda y cols. (poner referencia), en.En la gráfica se puede apreciar el uso creciente de florfenicol y oxitetraciclina, dejando prácticamente en el pasado a los otros antibióticos autorizados para este fin, de ellos Florfenicol corresponde a un antibiótico de uso exclusivo veterinario, no así oxitetraciclina. En 2020 el 92,2% de los antibióticos administrados estuvo destinado al tratamiento de **SRS (septicemia rickettsial salmonídea) ó piscirickettsiosis** (SERNAPESCA, 2020), la principal causa de mortalidad por enfermedad infecciosa de trucha arcoíris y salmón del atlántico en 2020 (SERNAPESCA, 2020).

Tabla 1: Antibióticos autorizados para su uso en salmonicultura y sus respectivos mecanismos de acción.

Antibiótico	Mecanismo de Acción
Ácido Oxolínico	Inhibe la replicación y reparación de ADN uniéndose a la topoisomerasa II causando muerte celular.
Amoxicilina	Inhibe la formación de la pared celular.
Eritromicina	se une al 50S del complejo 70S de ARNr inhibiendo la síntesis de proteínas.
Florfenicol	Se une al ARNr 23S de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de proteínas.
Flumequina	Inhibe la replicación y reparación de ADN uniéndose a la topoisomerasa II causando muerte celular.
Oxitetraciclina	Se une a la subunidad 30S del ribosoma bacteria, inhibiendo la síntesis de proteínas
Tiamulina	Se une al ARNr 23S de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de proteínas.

Tilmicosina

Se une al ARNr 23S de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de proteínas.

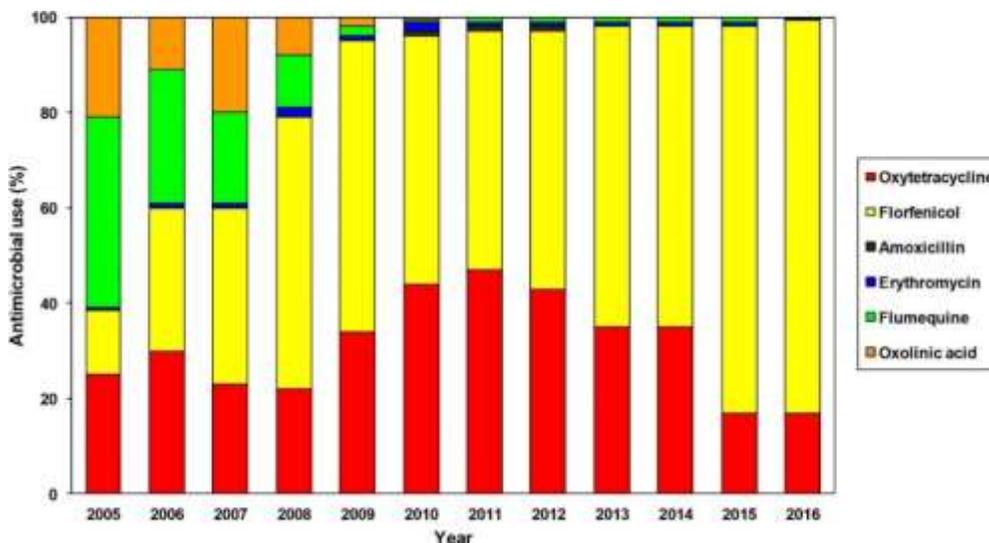


Figura 1: Proporción de uso de antibióticos en salmonicultura en Chile entre 2005 y 2016.

Obtenida desde la revisión bibliográfica de Miranda y cols, 2018.

1.2 *Piscirickettsia salmonis* su susceptibilidad a antibióticos.

La septicemia rickettsial salmonídea (SRS) o piscirickettsiosis es una enfermedad de carácter sistémico que afecta a los salmónidos cuyo agente etiológico es la bacteria *Piscirickettsia salmonis* (Fryer y cols, 1990); una Gamaproteobacteria, Gram-negativa, intracelular facultativa (Mikalsen y cols., 2008) aislada por primera vez en 1989 (Cvitanich y cols., 1991), pero se estima su presencia desde 1983 (Bravo y Campos, 1989). A partir de los distintos aislados de esta bacteria y la investigación sobre ellos, se ha logrado identificar diferencias en los fenotipos de infección, estos han sido asociados a diferencias genéticas entre las cepas, y se ha determinado que estas se agrupan en dos clados correspondientes a los genogrupos “tipo LF-89” y “tipo EM-90” (Bohle y cols., 2014; Mandakovic y cols., 2016; Otterlei y cols., 2016).

La diseminación y la replicación de este patógeno en su hospedero (o en salmones...) se manifiesta en branquias pálidas, hígado y riñones hemorrágicos, lo que causa una anemia severa y ulceración de aletas de los peces en las etapas más avanzadas de la enfermedad (Rise y cols., 2004). Esta enfermedad presenta una gran preocupación para el cultivo de salmón y se asocia a importantes pérdidas económicas. Además de Chile, se ha reportado su presencia en otras localidades que cultivan salmónidos como Canadá, Irlanda, Escocia y Noruega, pero con menor impacto y perdurabilidad de los brotes como en Chile (Fryer y Hedrick, 2003; Rozas y Enríquez, 2013).

Los primeros estudios que buscaron documentar la respuesta de *P. salmonis* a antibióticos fueron realizados en 1996 por Smith y cols. Analizaron cuatro cepas de *P. salmonis* entre las que se encontraban las actuales cepas de referencia LF-89 y EM-90 (aisladas en 1989 y 1990, respectivamente), junto con dos cepas aisladas y descritas por primera vez en ese trabajo: SLGO-94 y SLGO-95. En ese momento la única forma de cultivar la bacteria era en co-cultivo con la línea celular CHSE-24, por lo que se categorizaba como un patógeno intracelular obligado. A pesar de esas condiciones, el equipo de Smith y colaboradores lograron hacer las primeras determinaciones de CMI (concentración mínima inhibitoria) del patógeno *P. salmonis* en presencia de antibióticos utilizados en acuicultura. Concluyeron que las cepas aisladas para ese trabajo (SLGO-94 y SLGO-95) demostraron mayor resistencia que las cepas aisladas con anterioridad (LF-89 y EM-90). Entregando el primer antecedente que aislados más recientes tienen una respuesta distinta a los antibióticos que las cepas aisladas anteriormente.

En 2012 Yañez y cols., diseñaron un medio de cultivo (AUSTRAL-SRS) que permitió el cultivo independiente de células de *P. salmonis*, abriendo la posibilidad de estudiar a este patógeno de la forma estandarizada para otras bacterias. En 2014 este mismo

equipo evaluó la resistencia a antibióticos utilizados por la industria acuícola en dos cepas de *P. salmonis* (PPT-04 y PPT-05) con respecto a la cepa de referencia LF-89. Para ello, se utilizó el método sugerido en el manual CLSI (*Clinical and laboratory standards institute*) de 2006 para la determinación de CMI de bacterias patógenas, pero en lugar de medio Mueller-Hinton (sugerido por el manual) se utilizó el medio AUSTRAL-SRS, medio sugerido en el manual CLSI para la determinación de CMI en *P. salmonis*. Sin embargo, cabe destacar que el medio AUSTRAL-SRS no es un medio de composición definida, tampoco contiene los cationes divalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} ajustados como sugiere el manual para la determinación de CMI en otros patógenos. Los valores reportados de CMI para florfenicol correspondieron a concentraciones entre 0,25 y 1 $\mu g/mL$ y; entre 0,125 y 0,5 $\mu g/mL$ para oxitetraciclina. Estas concentraciones no corresponden a fenotipos resistentes en ningún patógeno, sin embargo, el punto de corte para determinar resistencia es especie dependiente por lo que surge la necesidad de determinar rangos que permitan establecer esta diferencia para estos antibióticos en *P. salmonis*.

En 2016 el grupo de Henríquez y cols., se propuso establecer los puntos de corte de CMI de los antibióticos utilizados en salmonicultura (4 de los 7 autorizados; ácido oxolínico, flumequina, florfenicol y oxitetraciclina) para distinguir los fenotipos (sensible y resistente) de distintas cepas de *P. salmonis*, realizando estos ensayos en 292 cepas. Sus resultados demostraron un comportamiento bimodal entre los aislados ensayados, según los autores el primer rango, más bajo en concentración, correspondería al comportamiento de las cepas silvestres/silvestres, fenotipo no resistente, y el segundo rango correspondería a aquellas concentraciones que determinarían un fenotipo resistente. Para quinolonas (ácido oxolínico y flumequina) determinaron que la CMI

sobre 0,125 – 0,25 µg/mL se consideraría resistente, para oxitetraciclina sobre 4 µg/mL. En el caso del florfenicol no se observó el comportamiento bimodal y el punto de corte se calculó en 2 µg/mL ubicado en una región intermedia del máximo observado en los aislados, lo que los autores atribuyeron a la adaptación a la exposición constante a este compuesto (Henriquez y cols., 2016). La importancia de este estudio radica en el número de aislados ensayados (292), lo que no se había realizado anteriormente y que permitió documentar el comportamiento de un gran número de aislados de este patógeno en respuesta a la administración de antibióticos. Sin embargo, los ensayos se realizaron utilizando el medio de cultivo ADL-PSB, que posee características similares en composición al medio sugerido por el manual CLSI (AUSTRAL-SRS), a pesar de esta diferencia, los valores registrados se encontraron en el mismo orden que los reportados por Yañez y cols., en 2014.

En el estudio de Cartés y cols. de 2017 se realizó por primera vez una aproximación desde la genómica, buscando genes de resistencia a antibióticos (GRA) que confirieran resistencia oxitetraciclina y florfenicol en tres genomas de *P. salmonis*, correspondientes a la cepa de referencia LF-89 (Pulgar y cols., 2015), a IBM009 y IBM034. De los GRA identificados, seleccionaron seis genes que estaban reportados como GRA asociados con la resistencia a florfenicol y oxitetraciclina (*tet-1*, *tet-C*, *tet-2*, *bcr/clfa*, *bcr2/clfa*, *bcr3/clfa*), cuantificaron el nivel de expresión de estos genes en las mismas tres cepas del análisis genómico, al cultivarlas con los antibióticos oxitetraciclina y florfenicol. Los resultados obtenidos indicaron que la cepa IBM-009 tiene una expresión significativamente mayor de los genes seleccionados con respecto a la cepa referencia LF-89 al cultivarla en presencia de antibiótico. Además, realizaron ensayos de CMI para estas cepas y los resultados indicaron que en el caso de la cepa IBM-009 se obtienen

valores de CMI para florfenicol de 2-8 µg/mL, concluyendo que esta cepa posee un mayor rango de resistencia que la cepa referencia.

Anteriormente en 2016 Bohle y cols., publicaron el genoma de una cepa de *P. salmonis*, AY3899B (genogrupo tipo LF-89), que contiene un plásmido con un cassette de genes que otorgan resistencia a múltiples antibióticos registrando una CMI para oxitetraciclina mayor a 256 µg/mL, la más alta de todas las CMI documentadas para *P. salmonis*, siendo la única cepa con un fenotipo resistente comparable de otros patógenos. La administración constante de antibióticos en el ambiente podría permitir la selección de cepas que contengan este plásmido, permitiendo la transferencia de estos genes al resto de la comunidad marina.

En este trabajo se planteó determinar el contenido de GRA en los genomas de cuatro cepas de *P. salmonis* (LF-90, EM-90, CGR02, PS12201A), 2 de cada genogrupo, incluyendo las cepas de referencia y otras aisladas con posterioridad con sus genomas secuenciados. Se plantea la identificación de GRA por medio de estrategias no reportadas para genomas de este patógeno y la determinación de su fenotipo de resistencia frente a los antibióticos utilizados por la industria acuícola para tratar los brotes infectivos de este patógeno en los medios productivos, mediante ensayos de sensidiscos y CMI. Además, se propone realizar la determinación de CMI tanto en el medio AUSTRAL SRS, como en medio CMMAB diseñado en el laboratorio a partir de un modelo metabólico de *P. salmonis*, al que además se le ajustarán los cationes divalentes, para determinar CMI como en otros patógenos de la manera que sugiere el manual CLSI (Ortíz-Severín y cols., 2021).

Tabla 2: Resumen de estudios realizados para estudiar el fenotipo de resistencia de *P. salmonis*.

Autores	Resultado Principal	Número de aislados
Smith y cols., 1996	Valores de CMI y CMB de CM, G, OTC, OA, y FLU a partir del efecto citopático en cultivos de celular CHSE-214.	4
Yañez y cols., 2014	Propusieron la utilización de un medio diseñado por ellos en 2012 para ensayos de susceptibilidad antibiótica.	3
Henríquez y cols., 2015	Describieron un fenotipo resistente a quinolonas por una mutación puntual en el gen <i>gyrA</i> .	20
Henríquez y cols., 2016	Valores de corte de fenotipos resistentes a FFC, OTC, OA y FLU.	292
Sandoval y cols., 2016	Florfenicol como modulador de la expresión de genes RND incrementando la actividad de las bombas de eflujo	2
Cartés y cols., 2017	Seis genes codificantes para proteínas de transporte específicas potencialmente importantes en resistencia a florfenicol y oxitetraciclina.	3 genomas
Contreras-Lynch y cols., 2017	Valores de corte de CMI para florfenicol y oxitetraciclina.	58
Bohle y cols., 2017	El genoma de un aislado resistente a oxitetraciclina cargando un plásmido con multi-resistente.	1 genoma
Saavedra y cols., 2017	Resistencia a oxitetraciclina en 8.1 % de los aislados y a quinolonas en el 71.3% de estos.	247

1.3 Antibióticos y genes de resistencia a antibióticos (GRA) asociados a su administración en salmonicultura y su impacto en las comunidades microbianas marinas.

En salmonicultura, la forma de administración de antibióticos más utilizada es a través de comida medicada, cuyos residuos se esparcen fácilmente en el mar. Estos restos de

comida sin digerir, al igual que las heces los peces tratados, contienen antibióticos que, debido a la conformación de las jaulas de cultivo, pueden llegar al sedimento marino, ser arrastradas por corrientes marinas, o ser ingeridas por otros animales capaces, a su vez, de dispersarlos por el océano (Cabello, 2006, 2004; Cabello y cols., 2013). La absorción efectiva de estos compuestos varía entre el 40 y 90 %, lo que genera que el resto de estos compuestos sea excretado y liberado al ambiente en las heces y orina de los peces (Kemper, 2008).

A nivel mundial el uso excesivo de antibióticos en la acuicultura ha causado problemas y preocupación debido al desarrollo y la diseminación de la resistencia bacteriana, los peligros para la seguridad alimentaria, los problemas ambientales y su posible transferencia a patógenos humanos originando un peligro de salud pública (Organización Mundial de la Salud, 2016). La evidencia sugiere que la administración antibióticos promueve la selección y propagación de un conjunto diversos de GRA que confieren resistencia, y que actúan como una presión selectiva que incita la transferencia de genes de resistencia entre organismos. Estudios en el mar Báltico documentaron que el uso de antibióticos enriqueció el ambiente natural en GRA y modificó su composición, además se enriqueció en elementos genéticos móviles debido a la presión selectiva originada por la presencia constante de antibióticos (Muziasari y cols., 2017).

Por otro lado, diversos estudios indican que los ambientes son reservorios naturales de GRA (Riesenfeld y cols., 2004; D'Costa y cols., 2006, 2007; Dantas y cols., 2008; Allen y cols., 2010; Donato y cols., 2010; Wright, 2010), estos reportan que, en distintos ambientes, incluso en aquellos denominados "prístinos", sin intervención humana, se pueden identificar GRA y que componen un elemento natural en los ambientes. A partir de estos estudios surge el concepto de "resistoma" (D' Costa, 2006) que consiste en la

colección de genes presentes que influyen directa o indirectamente a la resistencia antimicrobiana, considerando tanto los GRA de aquellos de organismos patógenos, como aquellos contenidos en los genomas de organismos no patógenos que dominan gran parte de los ambientes naturales.

En Chile, hasta el momento se han estudiado estos efectos del uso de antibióticos en la fracción cultivable, principalmente de muestras de sedimento marino, seguido de muestras de agua dulce y finalmente de agua marina, que es donde se realiza la mayor parte de la administración de estos compuestos. Miranda y Zemelman (2002) lograron obtener 103 aislados marinos resistentes a oxitetraciclina en lagos donde se cultivan salmones, describieron mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria rangos de CMI desde 64 a 2,048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oxitetraciclina para estos aislados. En un estudio posterior, los mismos autores describieron que de los 103 aislados resistentes, 74 de ellos resultaron ser resistentes de 6 a 10 antimicrobianos y la mayoría de ellos poseían resistencia a amoxicilina, eritromicina y furazolidona. Varios de estos aislados demostraron tener resistencia a florfenicol, cefotaxima y trimetoprim. En 2014, Shah y cols. estudiaron aislados cultivables de sitios expuestos y no expuestos a antibióticos en salmoniculturas chilenas sin poder establecer diferencias entre ellos y atribuyeron sus resultados a la limitación de trabajar sólo con aislados cultivables y al número de genes estudiados. En todos estos trabajos se han utilizado técnicas clásicas descritas para aislar y cultivar miembros de estas comunidades que posean resistencia antibióticos, complementándolos con la cuantificación de estos genes por qPCR como describe Suzuki y cols., 2018.

Como se mencionó, los estudios que se han realizado para entender el impacto del uso de antibióticos en las comunidades microbianas marinas de zonas expuestas a su uso

por la industria salmonera han descrito este fenómeno en la fracción cultivable, lo que limita el número de microorganismos estudiados y deja fuera de la búsqueda todos aquellos organismos no cultivables que contienen estos genes. Actualmente se pueden realizar estudios independientes de cultivo utilizando metagenómica. En 2019, Boolchandani cols. publicaron una revisión bibliográfica en la que recopilan y comparan las distintas estrategias y bases de datos actualmente utilizadas para la identificación de genes de resistencia a antibióticos *in silico*. Estos genes están en baja representación en las muestras y sus secuencias no siempre están representadas en bases de datos, por lo que hoy se utilizan distintas estrategias como a la búsqueda por homología de secuencias y por modelos ocultos de Markov (HMM), que se estructuran en base a alineamientos múltiples de secuencias conocidas y permiten la identificación de dominios funcionales con secuencias con bajo porcentaje de identidad para su identificación (Eddy, S. R., 1998).

Con estos antecedentes, en este proyecto también se busca reportar los genes de resistencia a antibióticos en las comunidades microbianas marinas de agua superficial expuestas al uso de compuestos antimicrobianos de la industria salmonera chilena en contraste a aquellas que no se encuentran expuestas a este tipo de presión selectiva utilizando técnicas independientes de cultivo.

Los objetivos planteados permitirán: (1) identificar *in silico* genes de resistencia a antibióticos tanto en las cepas de *P. salmonis*, como en los metagenomas de las comunidades microbianas marinas de aguas superficiales expuestas y no expuestas al uso de antibióticos. Las técnicas microbiológicas clásicas nos permitirán (2) determinar la sensibilidad de las cepas de *P. salmonis* a los antibióticos utilizados en el cultivo de salmónidos, (3) presentar para la determinación de CMI el medio CMMAB diseñado en

el laboratorio a partir de un modelo metabólico del patógeno que cumple con las condiciones de cultivo y determinación de CMI sugeridas por el manual CLSI y (4) contrastar los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in silico* para el patógeno *P. salmonis*.

1.4. Hipótesis

El uso de antibióticos para combatir la piscirickettsiosis en salmónidos en cultivo ha generado distintos niveles de resistencia en aislados del patógeno *Piscirickettsia salmonis* y en las comunidades bacterianas de ambiente marino expuestas a ellos, enriqueciendo el resistoma de estos ambientes con respecto a aquellos no expuestos a antibióticos.

1.5. Objetivo general

Identificar cepas de *P. salmonis* resistentes a antibióticos y predecir los GRA tanto en las cepas de *P. salmonis*, como en las comunidades bacterianas de muestras marinas de agua superficial, obtenidas desde zonas expuestas a los antibióticos utilizados en salmonicultura y desde zonas no expuestas a ellos.

1.6. Objetivos específicos

1.6.1 Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de *P. salmonis* a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de los GRA contenidos en sus genomas.

Este objetivo será realizado mediante ensayos con sensidiscos y determinación de CMI (concentración mínima inhibitoria) para cuatro cepas de *P. salmonis* (LF-89, EM-90, CGR02 y PS12201), utilizando el medio AUSTRAL SRS y el medio CMMAB, un medio definido diseñado en el laboratorio). Para la determinación *in silico*, la búsqueda de

genes de resistencia a antibióticos se realizará en los genomas de las cepas anteriormente mencionadas de *P. salmonis* y de este modo se contrastó la información contenida en sus genomas con los resultados obtenidos de forma experimental.

1.6.2. Identificar *in silico* GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.

Se utilizarán distintas bases de datos de genes de resistencia a antibióticos y HMM (modelos ocultos de Markov) para la identificación *in silico* de GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamiento antibiótico, esta misma estrategia será utilizada en el objetivo específico 1 para la búsqueda de GRA en los genomas de las cepas de *P. salmonis*.

Para ello, será necesario ensamblar y predecir genes y proteínas de los metagenomas con el fin de identificarlos y asignar taxonómicamente los *contigs* que contienen estos elementos.

X. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Objetivo específico 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de *P. salmonis* a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.

2.1.1. Cultivo de *P. salmonis*.

Las cepas de *P. salmonis* utilizadas (tabla 3) se crecieron rutinariamente en medio nutritivo AUSTRAL-SRS a 18°C y con agitación (Yañez y cols., 2012).

2.1.2 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante ensayos con sensidiscos en 12 cepas de *P. salmonis*.

Se realizaron ensayos utilizando sensidiscos (Oxoid), según el protocolo descrito por Otterlei y cols. en 2016 con modificaciones. Las bacterias se colectaron en fase exponencial de crecimiento, y se ajustaron a una densidad óptima medida a 600 nm (DO_{600}) = 1. Las suspensiones bacterianas se inocularon con un hisopo embebido en cultivo y arrastrado en distintas direcciones en placas de agar SRS, agar chocolate y agar sangre (Otterlei y cols., 2016). Luego, se dispusieron los sensidiscos correspondientes a los siguientes antibióticos: amoxicilina (AML 25), eritromicina (E 15), flumequina (UB 30), oxitetraciclina (OTC 30) y florfenicol (FFC 30), simultáneamente se realizaron ensayos con ampicilina y ceftazidima, pero no se vincularon con este estudio. Las placas de agar con los sensidiscos fueron incubadas a 18 °C hasta la formación de un halo de inhibición de crecimiento observable. Los halos se midieron como el radio de inhibición del crecimiento desde el borde del sensidisco hasta la zona de crecimiento bacteriano a los 7 días de incubación. Si aún no se formaba el halo hasta ese momento se realizó una evaluación posterior cada 2 días hasta observar la formación de éste y

poder documentar la inhibición del crecimiento. Estos ensayos se realizaron en triplicado para cada medio.

Tabla 3: Cepas de *P. salmonis* disponibles en el laboratorio de bioinformática y expresión génica del INTA (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos) de la Universidad de Chile.

NOMBRE	TIPO GENOGRUPO	HOSPEDERO	FECHA AISLADO	LUGAR	ÓRGANO	AISLADO POR:
LF-89	LF-89	Salmón Coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	Octubre-89	Chile	Riñón	JL Fryer, CN Lannan
EM-90	EM-90	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	1990	Chile	Riñón	Marine harvest
PSCGR01	LF-89	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	20-10-2010	X región, Chile	Riñón	ADL
8079	EM-90	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	10-02-2012	Chiloé, Chile	Riñón	Laboratorio ETECMA
CGR02	LF-89	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	30-04-2013	X región, Chile	Hígado	ADL
8942	LF-89	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	27-07-2015	Calbuco, Chile	Riñón	Laboratorio ETECMA
PS12201 A	EM-90	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	2017	Calbuco, Chile	Hígado	Laboratorio ETECMA
19647	EM-90	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	2018	Chiloé, Chile	Hígado	Laboratorio ETECMA
16557	LF-89	Salmón del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	10-07-2018	Calbuco, Chile	Riñón	Laboratorio ETECMA

NVI5692	LF-89	Salmón del Atlántico (<i>Salmo</i> <i>salar</i>)	Noviembre 2006	Noruega	Riñón	National Veterinary Institute, Oslo
NVI5892	LF-89	Salmón del Atlántico (<i>Salmo</i> <i>salar</i>)	No reportado	Canadá	No reportado	No reportado
NVI5896	LF-89	no conocido	No reportado	Noruega	No reportado	No reportado

2.1.3. Determinación de concentración mínima inhibitoria en 4 cepas de *P. salmonis*.

Para las pruebas de determinación concentración mínima inhibitoria (CMI) se seleccionó un subconjunto de las cepas utilizadas anteriormente, (LF-89, CRG02, EM-90 y PS12201A). Los antibióticos seleccionados para la determinación de CMI fueron: ácido oxolínico, eritromicina, florfenicol, flumequina y oxitetraciclina. De ellos, se tiene registro de aplicación en cultivo de salmónidos, algunos fueron utilizados en el pasado y otros son los principales antibioticos administrados en la actualidad. La metodología utilizada corresponde a la sugerida en el manual CLSI de 2014 agregando una modificación, ya que se utilizó el medio sugerido AUSTRAL-SRS (Yañez y cols, 2012) y un medio definido elaborado en nuestro laboratorio, denominado medio CMMAB, al que además se le realizó el ajuste de los cationes divalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} según indica el manual CLSI para ensayos de CMI (Ortíz-Severín y cols., 2021). Para los ensayos se realizaron ocho diluciones en proporción 1:2 en placas de 96 pocillos inoculando cada pocillo con cultivo bacteriano $DO_{600} = 0,01$, agregando medio o antibióticos según correspondía en cada caso en un volumen final de 100 μ L. El rango de concentración de los antibióticos utilizados se detalla en la Tabla 4.

En un principio se realizó un ensayo de prueba de todos los antibióticos partiendo desde el rango mínimo (0,01-10 µg/mL), que se fue modificando según fenotipo de resistencia. El resultado se evaluó a los siete días para el genogrupo tipo LF-89 y a los diez días para el genogrupo tipo EM-90.

Tabla 4: Rango de concentraciones de antibióticos utilizados para la prueba de concentración mínima inhibitoria en cepas de *P. salmonis*.

Antibiótico	Rango de Concentraciones Probados (µg/mL)
Ácido Oxolínico	0,01-10
Eritromicina	0,01-400
Florfenicol	0,01-20
Flumequina	0,01-40
Oxitetraciclina	0,01-10

2.1.4 Búsqueda e identificación de GRA en 4 cepas de *P. salmonis*.

Se identificaron GRA en los genomas de las cepas: LF-89 (GCA_000300295.4), CGR02 (GCA_001534725.1), EM-90 (GCA_003850185.1) y PS12201A (GCA_014622645.1). Este grupo está compuesto por dos cepas de referencia (LF-89 y EM-90) una de cada genogrupo documentado (tipo LF-89 y tipo EM-90) (Mauel y cols., 1999; Bohle y cols., 2014; Mandakovic y cols., 2016; Otterlei y cols., 2016), y otras dos, también una de cada genogrupo, aisladas con posterioridad a las de referencia; CGR02 aislada el año 2013 y PS12201A aislada en 2017. Los genomas de las cepas LF-89, CGR02 y EM-90, se descargaron desde la base de datos de NCBI. PS12201A no se encontraba en ese momento en NCBI, pero en el laboratorio contábamos con su genoma ensamblado, con su predicción de genes y proteínas. Por lo tanto, también se pudo incluir en este trabajo,

actualmente este genoma se encuentra disponible en la base de datos mencionada anteriormente.

La identificación de GRA se realizó mediante dos estrategias: (1) En primer lugar, se utilizó el software RGI (*Resistance Gene Identifier*) de CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, Alcock y cols., 2020) para identificar GRA por homología de secuencias. Para esto se utilizó la plataforma en línea de este programa (disponible en: <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) donde se subieron las secuencias aminoacídicas de las cuatro cepas, utilizando la opción “*include Loose*” como parámetro para que el programa incluyera dentro de los resultados aquellas proteínas con un porcentaje de identidad menor al 95 %, ya que por defecto RGI sólo incluye aquellos resultados con porcentaje de identidad > 95 % como resultados de la búsqueda. Los resultados descargados de la plataforma fueron filtrados y se seleccionaron aquellos con un porcentaje de identidad mayor al 35% y mayor a 50% de cobertura. (2) la segunda estrategia elegida, utiliza el software SARGFAM 2.0 (Yin y cols., 2018), que realiza la identificación de GRA utilizando HMMs (modelos ocultos de Markov) diseñados a partir de secuencias previamente descritas como GRA obtenidas de distintas bases de datos como CARD, ARDB y otras, utilizando para la identificación HMMER 3 en modo hmmscan (Finn y cols., 2011). Para ello, se utilizó la plataforma en línea disponible en <https://smile.hku.hk/SARGs>. Estos resultados se filtraron por valor de *e-value* menor a 1×10^{-5} y en caso de obtener dos resultados para una misma secuencia, nos quedamos con aquel con menor valor de *e-value*.

Los GRA obtenidos por ambas metodologías se unificaron y se eliminaron los redundantes utilizando la plataforma BatchEntrez de NCBI. El resultado se graficó en InteractiVenn disponible en <http://www.interactivenn.net/> (Heberle y cols., 2015).

2.2 Objetivo 2: Identificar *in silico* GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.

2.2.1 Toma de muestras

Las muestras marinas se clasificaron de acuerdo con su nivel de exposición a la perturbación ambiental, definida en este trabajo como los antibióticos administrados a los salmones en los centros de cultivo. La “zona expuesta” corresponde al centro reproductivo de salmones, ubicado en Quetén, Chiloé, X Región de los Lagos. La “zona no expuesta” a antibióticos corresponde a una muestra de la costa oeste en Puñihuil, Chiloé, X Región de los Lagos, dónde no hay centros acuícolas. En cada zona se tomaron tres muestras de 20 litros de agua superficial de mar en zonas que tienen 30 metros de profundidad aproximadamente. Durante las tomas de muestras se realizó la medición de los parámetros fisicoquímicos: temperatura y pH, utilizando un medidor multiparamétrico (IP67 COMBO PH/CONDUCTIVITY/ TDS/SALINITY/D.O. METER. Model 86021). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Dra. Patricia Águila en la Universidad Austral de Chile (Puerto Montt, Región de los Lagos) para su procesamiento.

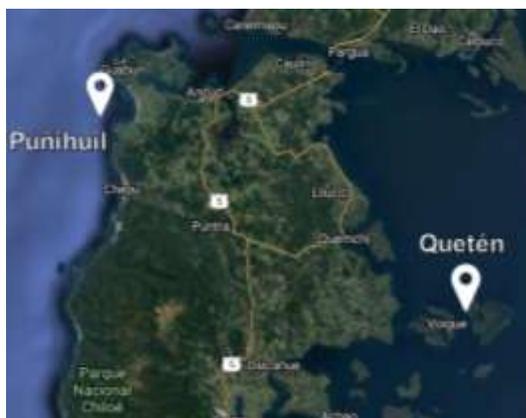


Figura 2: Ubicación de las muestras tomadas en la isla de Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. Puñihuil en la costa oeste como zona no expuesta a antibióticos y Quetén en la costa este, en medio de fiordios con alta actividad productiva, como zona expuesta a antibióticos.

2.2.2 Obtención de la biomasa de las muestras de agua de mar

La concentración de biomasa microbiana se realizó mediante una filtración seriada utilizando filtros de 3,0 μm y Sterivex de 0,22 μm con una bomba peristáltica (600 rpm), obteniéndose la fracción procariota y piconanoplanctónica eucarionte (De Vargas y cols., 2015). La filtración se realizó hasta saturar 3 filtros Sterivex de 0,22 μm por bidón colectado, es decir, 9 filtros por sitio. A cada uno de ellos se agregó 1mL de RNALater (Thermo Fisher®) y se conservaron en frío hasta su llegada al laboratorio.

En el laboratorio y bajo flujo laminar, se abrieron los filtros y se cortaron con bisturí en 16 trozos de 3 x 3 mm aproximadamente, estos fueron depositados en tubos de 2 mL y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.3. Extracción de ADN total

El protocolo utilizado corresponde a una adaptación del protocolo de Tillet y Neilan (2000). Se agregaron 790 μL de buffer X (1% xantogenato de potasio, 100 mM Tris-HCl

pH 7,4; 20 mM EDTA, pH 8; 800 mM acetato de amonio) al tubo con el filtro previamente cortado, 100 μ L de SDS 10% (dodecilsulfato sódico) y 100 μ L de Lisozima (10 mg/mL). La mezcla se agitó utilizando un vortex y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego, se agregaron 10 μ L de proteinasa k (20 mg/mL) a la mezcla y se realizó una incubación a 65°C en un baño termostático durante dos horas con agitación manual cada 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 4 μ L de RNasa A (25 mg/mL, Omega) y se realizó una incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las muestras se depositaron en hielo durante 30 minutos.

Después de la incubación en hielo se realizó una extracción orgánica con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), la mezcla se agitó utilizando un vortex hasta observar que la membrana del filtro se deshizo por completo, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C. Luego, se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 con el objetivo de eliminar el fenol residual, y la mezcla fue nuevamente centrifugada a máxima velocidad durante 15 minutos a 4 °C. Finalmente, se agregó un volumen de alcohol isopropílico y 1/10 de volumen de acetato de amonio 3 M, para la precipitación del material genético y se incubó a -20 °C durante una noche. La mezcla fue centrifugada a máxima velocidad por 45 min a 4 °C. El ADN precipitado se lavó con etanol 70%, y se centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante 30 minutos a 4°C. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el ADN depositado en el fondo del tubo se dejó secar a 37 °C en un horno de hibridación. El ADN se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

2.2.4 Visualización y cuantificación de ADN total

La visualización de todas las extracciones de ADN se realizó en geles de agarosa entre 1 y 2 % en TAE utilizando bromuro de etidio (EtBr) 0,5 µg/mL y la cuantificación se llevó a cabo mediante fluorimetría utilizando Qubit™.

2.2.5 Reacción de polimerasa en cadena y amplificación del gen ARNr 16S

Se realizó PCR utilizando partidores universales bacterianos 1492R y 27F para el gen de ARNr 16S a cada muestra de ADN extraído con los distintos tratamientos para corroborar el procedimiento anterior. La visualización se realizó como se describió en el punto 2.2.5.

2.2.6 Secuenciación de ADN total de la comunidad microbiana

La secuenciación y la elaboración de la biblioteca se externalizaron y fueron realizados por la compañía CD genomics, NY, USA. Se utilizó una cantidad total de 1 µg de ADN por muestra como material de entrada para las preparaciones de la muestra de ADN. Las bibliotecas de secuenciación se generaron utilizando el kit de preparación de bibliotecas de ADN NEBNext® Ultra™ para Illumina (NEB, EE. UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se agregaron códigos de índice a las secuencias de cada muestra. La muestra de ADN se fragmentó mediante sonicación a un tamaño de 350 pb, luego los fragmentos de ADN se pulieron en los extremos, se unieron colas poli A y se ligaron con el adaptador de longitud completa para la secuenciación de Illumina con más amplificación por PCR. Por último, los productos de PCR se purificaron (sistema AMPure XP) y las bibliotecas se analizaron para determinar la distribución de tamaño mediante el bioanalizador Agilent2100 y se cuantificaron mediante PCR en tiempo real. La biblioteca calificada se secuenció en Illumina Novaseq6000 con una configuración de

extremo pareado (*paired* *end*) de 150 pb.

2.2.7 Filtrado y control de calidad de las secuencias

Para el proceso de filtrado de las secuencias se utilizaron los programas:

- *Prinseq* (disponible en <http://prinseq.sourceforge.net>)
- *FastQC* (disponible en <http://bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)

Primero se utilizó el programa *FastQC* para evaluar la calidad de las secuencias brutas obtenidas desde la empresa de secuenciación, según aquellos aspectos que arrojaron bajos índices en la visualización de este proceso se utilizó *Prinseq* para filtrar las lecturas. Se consideraron los siguientes parámetros para filtrar: (1) corte de las secuencias en el extremo 5' desde la base 1 hasta la base 15; (2) filtro por el índice de calidad $q = 20$ que permite 1 error cada 100 pares de bases; (3) eliminación de las lecturas menores a 70 pb, y (4) utilización del algoritmo *dust* (1-100) con índice 7, que como indica el manual del programa sobre 7 la secuencia se clasifica como de baja complejidad (ej.: homopolímeros como TTTTTTTT tienen índice 100, TATATATA tiene índice 49, etc) y este algoritmo permite eliminarlas. Además, se eliminaron los repetidos, secuencias idénticas atribuidas a artefactos del proceso de secuenciación con la función *derep*. Posteriormente, se utilizó nuevamente *FastQC* para comprobar la calidad del filtro realizado.

2.2.8 Ensamble, predicción de proteínas y genes de la comunidad microbiana

Los ensamblajes de los metagenomas se realizaron utilizando meta-SPADES, desarrollado a partir del ensamblador SPADES (Bankevich y cols., 2012) con mejoras especializadas en el ensamblaje de metagenomas (Nurk y cols., 2017) con los parámetros

por defecto y utilizando como archivos de entrada los archivos indicados por *prinseq* como *Good_sequences*, con su respectivo par (R1 y R2 por ser secuenciación desde ambos extremos). Al obtener el resultado se eliminaron todos los *contigs* de menos de 500 pb y con ello se generó el archivo definitivo del ensamble. Luego, se evaluó la calidad de los ensambles utilizando metaQUAST, que evalúa y compara la calidad de los ensambles en base a alineamientos con secuencias de referencia (Mikheenko y cols., 2015). Después se realizó la predicción de genes y proteínas utilizando Prodigal v2.6.3, modo “meta” e ignorando la secuencia Shine-Dalgarno (Hyatt et al., 2010) que permite predecir genes y proteínas de bacterias que tienen distinto uso de codones. Por otro lado, este predictor de genes y proteínas se ejecuta rápidamente, sin supervisión, gestiona los *gaps* y genes no completos y además identifica eficientemente los sitios de inicio de traducción.

2.2.9 Identificación de GRA

Se utilizaron los mismos programas mencionados anteriormente en el punto 2.1.1 (RGI y SARGFAM). En este caso al utilizar RGI se utilizó la versión sin interfaz gráfica debido al tamaño del archivo de entrada, pero a diferencia de la búsqueda de GRA en los genomas de *P. salmonis* sólo se conservaron los resultados categorizados como *strict*, es decir, aquellos con un porcentaje de homología >97% de identidad de secuencia, ya que en este caso al tratarse de un metagenoma, y no de un genoma cerrado, la identificación por homología de secuencias con esta herramienta requiere incluir más parámetros según la representatividad de la secuencia y la profundidad de secuenciación que complejizan el análisis debido al número de secuencias que componen un metagenoma y que podrían tener un porcentaje de similitud aceptable contra secuencias de referencia, pero que no necesariamente corresponderían a los

genes buscados. En cuanto a SARGFAM se utilizó el mismo filtro mencionado en 2.1.4 ($e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$), ya que la búsqueda por HMM identifica dominios funcionales, por lo que los parámetros de representatividad y profundidad de la secuenciación en este caso no interfieren en la identificación del dominio funcional. En caso de obtener dos resultados para un mismo gen se eliminaron aquellos con mayor valor de $e\text{-value}$.

2.2.10 Abundancia relativa de genes GRA en los metagenomas

Para calcular la abundancia relativa de los GRA identificados se extrajeron las secuencias del archivo de genes mediante el programa *Seqtk* (disponible en <https://github.com/lh3/seqtk>) utilizando el modo *subseq*.

El archivo generado con el nombre del gen y su secuencia se utilizó para crear un índice para hacer el reclutamiento de lecturas mediante el uso del *software Bowtie2* v2.2.6 (Langmead y Salzberg, 2012), con parámetros predeterminados, se reclutaron las lecturas de los metagenomas correspondientes a los genes identificados anteriormente. A los archivos de salida de *Bowtie2* se les realizó el siguiente proceso para obtener un resultado en forma de tabla y liviano.

```
sed '1,5d' bowtie2_output.sam > bowtie2_output_2.sam
samtools view -bS bowtie2_output_2 | samtools sort -o bowtie2_output3
#se genera un archive.bam (bowtie2_output3)
samtools index bowtie2_output3
samtools idxstats bowtie2_output3 > bowtie2_output3.idxstats
```

La abundancia obtenida de lecturas para cada gen se normalizó por el largo ese gen y la cantidad de lecturas utilizadas para el ensamble como indica la ecuación a continuación.

$$Abundancia\ relativa = \frac{Reads\ reclutados}{Largo\ gen * total\ de\ reads\ metagenoma} * 1.000.000.000$$

2.2.11 Asignación taxónomica y abundancia relativa de contigs que contienen GRA.

Para la obtención de estos datos se hizo una lista de los *contigs* que contenían GRA. Con esa información se buscaron las secuencias nucleotídicas de estos *contigs* en el archivo generado el ensamble y posteriormente filtrado por tamaño utilizando *seqtk*. Con ello se procedió a realizar un BLASTn contra la base de datos nt de NCBI (Wheeler y cols., 2007). La asignación taxonómica finalmente se realizó utilizando el archivo de salida de BLASTn como archivo de entrada para MEGAN6 (Huson y cols., 2016). De aquellas secuencias asignadas a nivel de Filo y Orden se obtuvieron las secuencias nuevamente utilizando *seqtk* y se procedió a hacer el reclutamiento de lecturas con *Bowtie2* y el proceso posterior como se indicó anteriormente. El resultado de esto se normalizó de la siguiente manera:

$$Abundancia\ relativa = \frac{Reads\ reclutados}{Largo\ contig * total\ de\ reads\ metagenoma} * 1.000.000.000$$

2.2.12 Construcción de gráficos de genes de GRA y taxonomía de los contigs que los contienen.

Se utilizó el paquete *ggplot2* (Wickham H., 2016) de R (R Core Team, 2014). Utilizando como archivo de entrada una tabla con toda la información obtenida por método de búsqueda de GRA y ambas muestras en ella. De forma similar la tabla con los datos obtenidos de la asignación taxonómica.

XI. 3. RESULTADOS

3.1. Objetivo 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de *P. salmonis* a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.

3.1.1 Búsqueda e identificación de genes de resistencia a antibióticos (GRA) en genomas de 4 cepas de *P. salmonis*.

Se utilizaron dos estrategias de búsqueda de GRA, una busca por homología de secuencias utilizando el programa RGI de CARD (Alcock y cols., 2020) y la otra utiliza SARGFAM (Yin y cols., 2018). El número de potenciales GRA identificados para cada cepa y estrategia se presentan en la tabla 5. El detalle de los genes identificados se puede apreciar en la tabla 6 para SARGFAM y en la tabla 7 para RGI. Ambos métodos predijeron un número similar de GRA en los genomas de las cepas de *P. salmonis*. Se utilizó *BatchEntrez* de NCBI para eliminar los resultados redundantes (genes que arrojaron un resultado en ambas búsquedas) obteniéndose finalmente 99 GRA en la cepa LF-89, 99 en la cepa CGR02, 91 en la cepa EM-90 y 101 en la cepa PS12201A. A pesar de identificar un número similar de genes mediante las distintas estrategias, solo una parte de ellos fueron comunes para ambas metodologías.

Dado que 3 de los 4 genomas estudiados se encontraban disponibles en NCBI, sus proteínas y genes ya tenían un código asignado que permitió agrupar los resultados de ambas estrategias de búsqueda. En el caso de la cepa PS12201A, que al momento de la búsqueda no se encontraba en NCBI, se buscaron los genes manualmente mediante BLAST, logrando identificar el código de los genes identificados como GRA.

Tabla 5: GRA identificados mediante dos estrategias para cuatro cepas de *P. salmonis*.

	GRA identificados			Total (sin redundantes)
	RGI	SARGFAM	RGI + SARGFAM	
LF-89	44	64	108	99
CGR02	45	64	109	99
EM-90	43	62	105	91
PS12201A	45	69	114	101

Tabla 6: GRA identificados mediante SARGFAM para cuatro cepas de *P. salmonis*. En esta tabla se detallan los genes identificados utilizando la base de datos de modelos ocultos de Markov (HMM) de SARGFAM y cuantas veces se identificaron estos genes en las cepas LF-89, CGR02, EM-90 y PS12201A.

		Búsqueda por HMM (SARGFAM)				
	Antibiótico	LF-89	CGR02	EM-90	PS12201A	
<i>arnA</i>	polimixina	5	5	5	5	5
<i>bacA</i>	bacitricina	1	1	1	1	1
<i>bcrA</i>	multidroga	6	6	8	7	7
<i>bcr</i>	multidroga	3	3	5	5	5
<i>emrD</i>	multidroga	3	3	2	2	2
<i>ksgA</i>	kasugamicina	1	1	1	1	1
<i>macB</i>	macrolidos	3	3	4	4	4
<i>marR</i>	multidroga	3	3	1	3	3
<i>mdtK</i>	multidroga	2	2	2	2	2
<i>mdtN</i>	multidroga	1	1	1	1	1
<i>mexH</i>	multidroga	4	4	4	4	4
<i>mexT</i>	multidroga	2	2	1	3	3
<i>ABC_t</i>	multidroga	5	5	5	5	5
<i>PBP_1A</i>	beta-lactámicos	1	1	1	1	1
<i>PBP_1B</i>	beta-lactámicos	4	1	1	1	1
<i>penA</i>	beta-lactámicos	2	2	2	3	3
<i>rosB</i>	fosmidomicina	3	3	3	3	3
<i>strp_acyl</i>	aminoglucosidos	1	1	0	1	1
<i>ToIC</i>	multidroga	2	2	2	2	2
<i>vanS</i>	vancomicina	9	9	7	8	8
<i>vanT</i>	vancomicina	2	2	3	3	3
<i>vanX</i>	vancomicina	1	1	1	1	1
<i>vanY</i>	vancomicina	1	1	1	1	1
<i>ykkC</i>	multidroga	1	1	1	1	1
<i>ykkD</i>	multidroga	1	1	1	1	1

Tabla 7: GRA identificados mediante RGI para cuatro cepas de *P. salmonis*. En esta tabla se detallan los ARO (*Antibiotic resistance ontology*) de los genes identificados mediante RGI (*Resistance Gene Identifier*) de CARD (*Comprehensive antibiotic resistance database*) y cuantas veces fueron identificados estos genes en las cepas LF-89, CGR02, EM-90 y PS12201A.

Búsqueda por Homología (RGI)						
ARO	Antibiótico	LF-89	CGR02	EM-90	PS12201A	
AAC(6')-33	aminoglucosidos	1	1	1	1	1
arnA	polimixina	1	1	1	1	1
basS	polimixina	1	1	1	1	1
bcrA	multidroga	1	0	1	0	0
gyrA	fluoroquinolona	1	1	1	1	1
gyrB	fluoroquinolona	1	1	1	1	1
cmIA5	fenicoles	1	1	0	0	0
cpxA	aminoglucosidos	0	0	1	1	1
dfrA3	diaminopirimidina	1	1	1	1	1
acrR	multidroga	0	0	1	1	1
EF-Tu	elfamicina	1	1	1	1	1
emrE	macrolidos	1	1	1	1	1
fabI	multidroga	1	1	1	1	1
evgS	multidroga	1	1	1	1	1
golS	multidroga	1	1	1	1	1
hp1181	multidroga	3	1	1	1	1
macB	macrolidos	1	3	1	1	1
MexI	multidroga	1	1	0	0	0
MexL	multidroga	1	1	0	0	0
MexS	multidroga	3	1	1	1	1
MexV	multidroga	0	0	1	1	1
MexW	multidroga	2	3	3	3	3
mfpA	quinolonas	1	1	1	1	1
msbA	multidroga	0	1	1	1	1
mtrA	multidroga	1	1	0	0	0
rpoB	rifampicina	1	1	1	1	1
thyA	ácido paraminosalicílico	1	1	1	1	1
pilQ	betalactámicos	0	0	0	0	1
PBP2	betalactámicos	0	0	1	1	1
NmcR	betalactámicos	1	0	0	0	0
otr(A)	tetraciclinas	1	1	1	1	1
PmrF	antibiótico peptídico	1	1	2	2	1
CpxR	multidroga	1	1	1	1	1
rphA	rifamicina	1	1	1	1	1
fusA	ácido fusídico	1	1	1	1	1
GlpT	fosfomicina	1	1	1	1	1
murA	fosfomicina	1	1	1	1	1
rpoC	daptomicina	1	1	1	1	1
parY	aminocoumarina	1	1	1	1	1
TaeA	pleuromutilina	1	1	1	1	1
tet(41)	tetraciclina	1	1	0	0	0
tet32	tetraciclina	1	1	1	1	1
tetA(48)	tetraciclina	1	0	1	0	0
tetA(58)	tetraciclina	0	0	0	0	1
ToIC	multidroga	2	1	1	1	1
vanRB	vancomicina	1	2	1	1	1
vanTrL	vancomicina	1	1	1	1	1
vanUG	vancomicina	1	1	1	1	1
vanXF	vancomicina	0	0	1	1	1
ykkC	multidroga	1	1	1	1	1
ykkD	multidroga	1	1	1	1	1

LF-89 y CGR02 comparten 91 GRA, EM-90 y 12201 comparten 80 GRA. La mayoría de los GRA se encuentran compartidos entre los representantes de los respectivos genogrupos (tipo LF-89 y tipo EM-90). Además, se encontraron genes exclusivos en todas las cepas estudiadas, LF-89 tiene 2, CGR02 tiene 4, EM-90 tiene 5 y PS12201A tiene 15. Estos resultados se pueden apreciar en la figura 3.

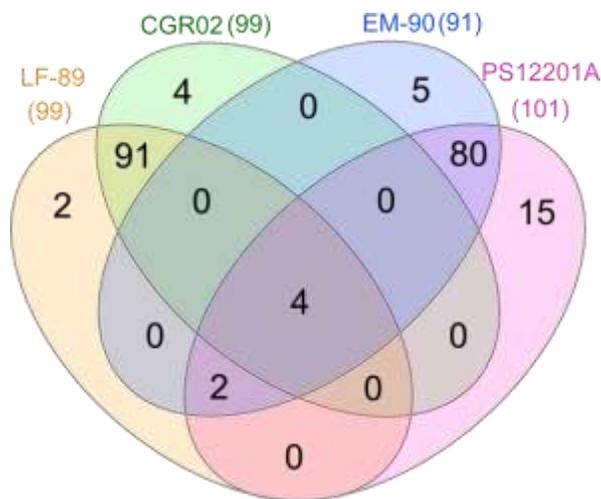


Figura 3: Genes de resistencia a antibióticos (GRA) identificados en cuatro cepas de *P. salmonis*. Diagrama de Venn donde se grafican los GRA identificados mediante dos estrategias (RGI y SARGFAM) en cuatro cepas de *P. salmonis* (LF-89, CGR02, EM-90 y PS12201A), y los genes compartidos entre las cepas.

Luego, se seleccionaron aquellos GRA relacionados con antibióticos o familias de antibióticos autorizados para su uso en la industria salmonera y que fueron identificados en alguna de las 4 cepas de *P. salmonis*. Ellos fueron clasificados según el antibiótico con que se relaciona el gen de resistencia y su mecanismo de acción. El resultado de esta clasificación se aprecia en la tabla 8.

Entre los resultados obtenidos se encuentran varios genes que confieren resistencia a múltiples tipos de antibióticos, los mecanismos de resistencia de éstos se vinculan principalmente con el eflujo de los compuestos, y en el caso de *marR* y *acrR* también con alteración del blanco del antibiótico.

Tabla 8: GRA identificados en alguna de las cepas de *P. salmonis* relacionados con antibióticos o familias de antibióticos autorizados para su uso en salmonicultura.

ARO	Antibiótico	Mecanismo de Resistencia
<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	fluoroquinolonas	Alteración del blanco antibiótico
<i>marR</i>	tetraciclinas, rifamicina, penacilinas, glicilciclina, fenicoles, cefalosporinas, triclosan, fluoroquinolonas	Alteración del blanco antibiótico
<i>acrR</i>	tetraciclinas, penacilinas, fenicoles, rifamicina, glicilciclina, cefalosporinas, triclosan, fluoroquinolonas	Eflujo de antibiótico
<i>cmlA5</i>	fenicoles	
<i>CpxR</i>	Péptidos, diaminopirimidina, aminocumarina, sulfonamidas, penacilinas, fluoroquinolonas, macrolidos , cefalosporinas, aminoglicosidos, tetraciclinas , fenicoles, monobactam, cephamycin	
<i>emrE</i>	macrolidos	
<i>evgS</i>	macrolidos, fluoroquinolonas , penacilinas, tetraciclinas	
<i>golS</i>	fenicoles , cephamycin, monobactámicos, penacilinas, cefalosporinas	
<i>hp1181</i>	tetraciclinas , nitroimidazol, fluoroquinolonas	
<i>macB</i>	macrolidos	
<i>mdtK</i>	fluoroquinolonas	Eflujo de antibiótico
<i>mexH,</i> <i>mexI</i>	tetraciclinas, fluoroquinolonas , tinción de acridina	
<i>mexL</i>	macrolidos, tetraciclinas , triclosan	
<i>mexS,</i> <i>mexT</i>	fenicoles , diaminopyrimidine, fluoroquinolonas	
<i>mexV,</i> <i>mexW</i>	macrolidos, tetraciclinas, fenicoles , tinción de acridina, fluoroquinolonas	
<i>tet(41),</i> <i>tetA(58)</i>	tetraciclinas	
<i>TolC</i>	peptide, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrolidos , aminoglicosidos, cefalosporinas, fenicoles, rifamicina, penacilinas, glicilciclina, aminocumarina, cephamicina, triclosan	
<i>ykkC,</i> <i>ykkD</i>	tetraciclinas, fenicoles , aminoglicosidos	
<i>mfpA</i>	fluoroquinolonas	
<i>otr(A)</i>	tetraciclinas	Protección del blanco antibiótico

3.1.2 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante la utilización de sensidiscos en 12 cepas de *P. salmonis*.

Se realizó un ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano utilizando sensidiscos con 5 antibióticos autorizados para su uso en salmonicultura (Amoxicilina, Eritromicina, Flumequina, Oxitetraciclina y Florfenicol). Se observaron dos fenotipos, en uno de ellos

se formó un claro halo de inhibición y en el otro una disminución del crecimiento, pero no se observó la formación de halo (figura 4).

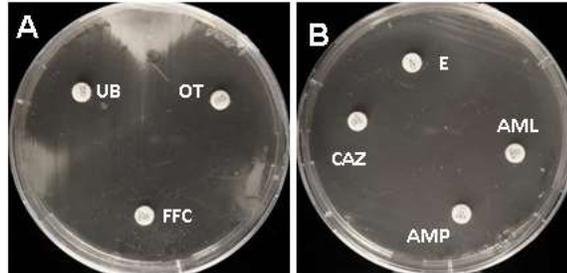


Figura 4: Sensibilidad a los antibióticos utilizados en salmicultura. Imágenes representativas del ensayo de sensidiscos realizados con 12 cepas de *P. salmonis*. Se muestran los resultados con la cepa EM-90. En A se puede observar la formación de halos de inhibición de crecimiento para los antibióticos flumequina (UB), oxitetraciclina (OT) y florfenicol (FFC). En B, sólo con el antibiótico eritromicina (E) se logró observar un halo de inhibición. Simultáneamente se realizaron pruebas de sensibilidad a ceftazidima (CAZ) y ampicilina (AMP), pero no se vincularon a este estudio.

En caso de que se observara el halo, se midió desde el límite de la inhibición del crecimiento del cultivo hasta el borde del sensidisco (radio del halo). Este ensayo se realizó en los tres medios de cultivo utilizados para estas pruebas por Otterlei y cols., en 2016. Sin embargo, sólo se logró la medición de los halos, en todas la cepas y réplicas, en el medio AUSTRAL-SRS. En los medios agar chocolate y sangre se logró cuantificar el halo en algunas de las cepas y en parte de las réplicas, por lo que estos medios fueron descartados, ya que no permitieron la reproducibilidad de los resultados. En la tabla 9 se indican los valores obtenidos correspondientes al promedio de las mediciones realizadas ($n = 3 \pm$ la desviación estándar de estos). A partir los resultados obtenidos se logró detectar la sensibilidad de las cepas a eritromicina, florfenicol, oxitetraciclina y flumequina. Mediante una prueba de Kruskal-Wallis determinó una diferencia significativa entre los valores obtenidos para florfenicol y eritromicina en la mayoría de

las cepas (todas, excepto PSCGR01 y EM-90). En el caso de la amoxicilina se detectó crecimiento cerca del sensidisco, sin embargo, el crecimiento observado se vio atenuado con respecto al crecimiento de la bacteria en placas sin antibiótico y no resultó ser cuantificable. Este experimento nos permitió obtener una primera aproximación al comportamiento de las cepas disponibles en nuestro cepario frente a antibióticos. Al ser un ensayo con poca reproducibilidad de los datos y con diferencias entre las mediciones realizadas se planteó continuar los experimentos con un subconjunto de las cepas y realizar ensayos de CMI (concentración mínima inhibitoria) para tener un resultado cuantificable.

Tabla 9: Ensayo de inhibición de crecimiento en 12 cepas de *P. salmonis*. Valores de radio en milímetros obtenidos para 5 antibióticos probados 12 cepas de *P.salmonis* en medio agar AUSTRAL-SRS.

Cepa	Antibiótico				
	AML	E	UB	OT	FFC
LF-89	ND	10,67 ± 0,58	16,3 ± 1,53	22 ± 0	23 ± 3
PSCGR01	ND	13,3 ± 1,53	20,33 ± 2,08	22 ± 3,6	22,3 ± 4,5
CGR02	ND	9,33 ± 3,05	17,67 ± 2,51	21 ± 2	23,6 ± 3,51
8942	ND	10 ± 1	19,33 ± 4,9	19,67 ± 2,87	23,67 ± 4,16
16557	ND	11 ± 6	18 ± 2,65	20,67 ± 2,1	24,67 ± 4
NVI5692	ND	9 ± 1,73	21,67 ± 2,88	21,33 ± 4,16	26 ± 5,29
NVI5892	ND	6 ± 1	20 ± 3	20,33 ± 1,52	25,67 ± 1,15
NVI5896	ND	7,67 ± 1,53	19,33 ± 2,08	16,67 ± 3,21	24 ± 1
EM-90	ND	12 ± 1	16 ± 5,29	17,67 ± 6,66	20,33 ± 8,96
PS12201A	ND	9,67 ± 0,58	16 ± 1	13,3 ± 1,53	20 ± 0
8079	ND	10, 33± 0,58	14,67 ± 1,53	15,67 ± 1,15	19,67 ± 1,53
19647	ND	10 ± 1	18, 6 ± 1,5	16,33 ± 2,54	20 ± 1

3.1.3 Determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 cepas de *P. salmonis*.

Para este ensayo se seleccionó un subconjunto de las cepas anteriormente probadas, el mismo utilizado para la búsqueda e identificación de GRA en sus genomas. LF-89 y CGR02 del genogrupo tipo LF-89 cuatropantibióticos frente a los cuales la bacteria demostró sensibilidad en el ensayo anterior, eritromicina, florfenicol, flumequina y oxitetraciclina, todos ellos son utilizados por la industria acuícola, además se incluyó el ácido oxolínico, autorizado y utilizado en salmonicultura. El ensayo se realizó como estipula el manual CLSI (2014) para *P. salmonis*, y paralelamente, se agregó una modificación evaluando el medio CMMAB diseñado en el laboratorio basado en el modelo metabólico de Cortés y cols. (2017). El resultado del ensayo se evaluó a punto final a los 7 días desde el montaje del ensayo para el genogrupo tipo LF-89 y a los 10 días desde el montaje para el genogrupo tipo EM-90. Al cabo de 7 o 10 días de incubación, las placas lucen como se observa en el ejemplo en la figura 5. Para determinar la CMI se registró el punto en que la concentración del antibiótico inhibió el crecimiento de la bacteria con respecto al control (n = 6). Los resultados de los rangos obtenidos por cepa y antibiótico se pueden apreciar en la tabla 10.

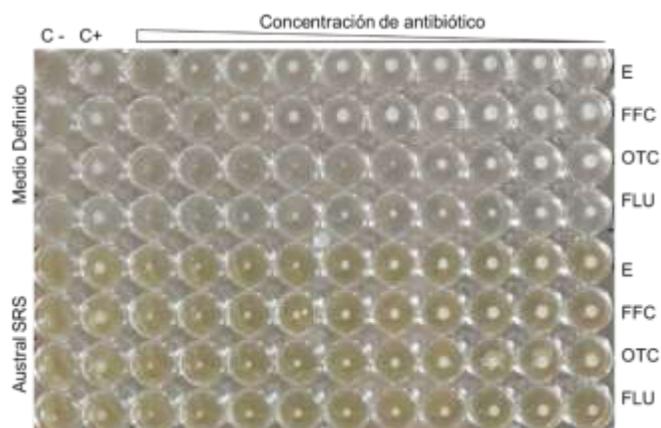


Figura 5: Ensayo de determinación de CMI (concentración mínima inhibitoria). Imagen representativa de una placa de 96 pocillos en los que se realizaron los ensayos de cada cepa de *P. salmonis* evaluadas en este trabajo, en la parte superior se montó el ensayo en medio CMMAB y en la parte inferior de la placa en medio AUSTRAL-SRS. A lo ancho de la placa se montó la disminución de la concentración de los antibióticos indicados en el costado derecho, con sus controles respectivos al lado derecho.

Tabla 10: Rangos de CMI (Concentración mínima inhibitoria) obtenidos para cinco antibióticos de uso en salmicultura. Valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$) obtenidos para las cepas LF-89, CGR02, EM-90 y PS12201A de *P. salmonis* en medio líquido AUSTRAL-SRS y en medio CMMAB diseñado en el laboratorio (Ortiz-Severín y cols., 2021). En rojo se indican aquellos rangos que muestran una diferencia entre medios.

		Antibiótico ($\mu\text{g/mL}$)				
		Ácido Oxolínico	Eritromicina	Florfenicol	Flumequina	Oxitetracilina
LF-89	CMMAB	0,04-0,32	1,6 - 25	0,08 - 0,64	0,08 - 0,16	0,02 - 0,16
	SRS	0,32 - 0,64	1,6 - 6,4	0,08 - 1,28	0,64 - 1,28	0,08 - 0,64
CGR02	CMMAB	0,08 - 0,32	1,6 - 6,4	0,04 - 1,28	0,02 - 0,32	0,02 - 0,16
	SRS	0,32 - 1,28	1,6 - 12,8	0,04 - 1,28	0,08 - 1,28	0,02 - 0,32
EM-90	CMMAB	0,02 - 0,08	3,2 - 12,8	0,04 - 1,28	0,02 - 0,04	0,02 - 0,64
	SRS	0,02 - 0,16	0,4 - 1,6	0,04 - 0,32	0,04 - 0,32	0,08 - 0,32
PS12201A	CMMAB	0,02 - 0,04	0,8 - 6,4	0,04 - 1,28	0,02 - 0,08	0,02 - 0,16
	SRS	0,04 - 0,16	0,8 - 3,2	0,04 - 0,32	0,02 - 0,16	0,08 - 0,32

A partir de estos resultados se puede decir que ninguna de las cepas de *P. salmonis* utilizadas en estos ensayos posee resistencia a los antibióticos utilizados en

salmonicultura a pesar de contener genes en su genoma que podrían otorgarle algún grado de resistencia. Sin embargo, se registró una diferencia entre los rangos de valores obtenidos entre los medios (en rojo en la tabla 10), lo sucedió para todos los antibióticos probados y en todas las cepas, sólo algunos resultados compartieron límites y órdenes de los rangos entre ambos medios o se diferenciaban en una dilución (en negro en la tabla 10). Estos resultados demuestran que se requieren más estudios para la estandarización de las determinaciones de CMI de este patógeno, ya que, al utilizar un medio definido, se observan que algunos de los rangos de CMI varían entre un medio y otro a la misma concentración de antibiótico, y como se documentó recientemente en el trabajo de Ortiz-Severín y cols. (2021), la disponibilidad de nutrientes afecta el fenotipo de resistencia de este patógeno, haciendo aún más necesario realizar estas determinaciones en un medio definido acorde con lo reportado para otros patógenos.

3.2: Objetivo 2: Identificar *in silico* GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.

3.2.1 Extracción y cuantificación del ADN extraído.

El protocolo de extracción de ADN utilizado corresponde a una adaptación del protocolo de Tillet & Neilan (2000). Los resultados de la cuantificación de ADN que se muestran en la tabla 11, y su integridad se puede apreciar en la figura 6. Las concentraciones y calidad del ADN obtenido superaron aquellas solicitadas por la empresa que realizó la secuenciación.

Tabla 11: Cuantificación por Qubit de las muestras de ADN total del sitio no expuesto a antibióticos (Puñihuil) y del sitio expuesto a antibióticos (Quetén).

Muestra	Concentración (ng/ μ L)
Puñihuil (sitio no expuesto)	40,6
Quetén (sitio expuesto)	31,2

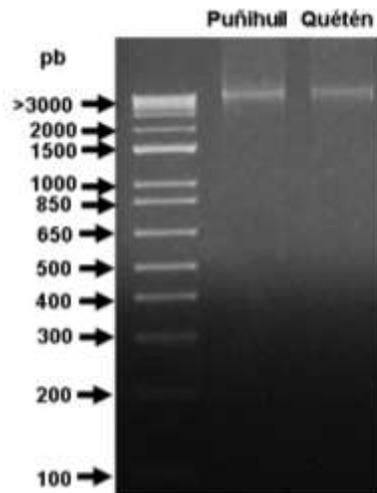


Figura 6: Integridad de ADN total extraído de la fracción bacteriana a partir de filtros Sterivex. La imagen corresponde a un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio 0,5 μ g/mL. En el primer carril se aprecia el tamaño de referencia, en el segundo el ADN total extraído de Puñihuil (sitio no expuesto a antibióticos) y en el tercer carril el ADN de Quetén (sitio expuesto a antibióticos), se cargaron 2 μ L de cada muestra en el carril correspondiente. 1 μ g de cada muestra fue enviado a secuenciar al centro CD Genomics, USA.

3.2.2 Datos de secuenciación de ADN total de la comunidad microbiana. Filtrado y control de calidad de las secuencias

Se recibieron 88.511.754 de lecturas para la muestra de Puñihuil (sitio no expuesto a antibióticos) y 77.429.919 de lecturas para Quetén (sitio expuesto a antibióticos). Estas lecturas se sometieron a un filtro que eliminó aquellas secuencias de baja complejidad (por ejemplo, TATATATA, CCCCCC, etc.), secuencias repetidas, aquellas que contienen

nucleótidos no asignados (N), bases asignadas con bajo índice de calidad ($Q < 30$) y las secuencias de menos de 70 pb de longitud. Finalmente, se obtuvieron 31.898.090 de secuencias para la muestra de Puñihuil y 30.013.610 para la muestra de Quetén. Estas lecturas se sometieron nuevamente a una prueba de calidad utilizando *FastQC*, indicando que las secuencias filtradas se encontraron en los rangos de calidad esperados después del proceso de filtrado descrito anteriormente.

3.2.3 Ensamble, predicción de proteínas y genes de la comunidad microbiana

Con las lecturas filtradas se procedió a construir los ensamblajes utilizando *metaSPADES* (Nurk y cols., 2017), eliminando aquellos *contigs* con menos de 500 pb de longitud. Producto de ello se obtuvo 205.330 *contigs* para la muestra de Puñihuil (sitio no expuesto a antibióticos) y 165.412 *contigs* para Quetén (sitio expuesto a antibióticos). La calidad de este ensamble se verificó utilizando *metaQUAST* (Mikheenko y cols., 2015). A partir de los ensamblajes verificados, se realizó la predicción de genes y proteínas del metagenoma utilizando el programa Prodigal v2.6.3. Con ello, se lograron obtener 380.759 proteínas predichas con sus correspondientes genes para Puñihuil, y 248.417 para Quetén. Con esta información se procedió a identificar aquellas secuencias de proteínas predichas que codifican potenciales genes de resistencia a antibióticos.

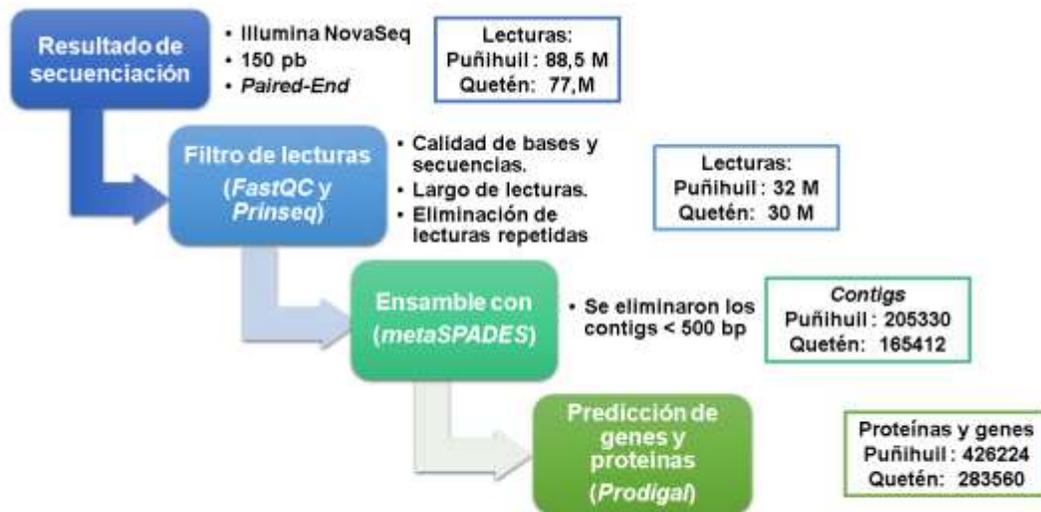


Figura 7: Diagrama de flujo del proceso de filtrado, ensamble y predicción de genes y proteínas. En este diagrama se resumen los procesos y programas utilizados para cada etapa del proceso descrito. Además, algunas condiciones o características importantes de cada etapa. Además, se indica en los recuadros laterales los resultados de cada etapa para cada una de las muestras.

3.2.4 Identificación de GRA (Genes de Resistencia a Antibióticos) en metagenomas.

La identificación de GRA en los metagenomas se realizó mediante las dos estrategias de búsqueda utilizadas anteriormente con los genomas de *P. salmonis*. Para ambas estrategias se utilizaron como archivo de entrada las proteínas predichas anteriormente para cada metagenoma.

Al utilizar SARGFAM (colección de HMM para búsqueda de GRA) se lograron identificar 3.765 secuencias codificantes para GRA en el metagenoma de Puñihuil y 2.099 en el de Quetén. Por otra parte, con RGI de CARD se identificaron 12 secuencias en el metagenoma de Puñihuil y 10 en el de Quetén, ya que sólo se consideraron las secuencias clasificadas como *strict*, es decir, secuencias con un porcentaje de identidad

de secuencia mayor al 97%. En ambos metagenomas se lograron identificar genes que confieren resistencia a antibióticos pertenecientes a distintas familias, tales como: aminoglucósidos, bacitracina, betalactámicos, fosmidomicina, ácido fusídico, MLS (macrólidos – lincosamidas – streptograminas), multidroga, fenicoles, polimixina, quinolonas, rifamicina, sulfonamidas, tetracenomicina C, tetraciclina y vancomicina. Todas estas familias de antibióticos están representadas en ambos metagenomas, excepto en el caso de los genes que confieren resistencia a fosfomicina, que se encontraron exclusivamente en Quetén. El detalle de los genes identificados para cada categoría se presenta en la tabla 12.

Con esta información y los resultados filtrados, se procedió a extraer de los archivos las secuencias nucleotídicas de las proteínas identificadas como GRA, y estas se utilizaron para calcular la abundancia relativa de estos en cada metagenoma.

Tabla 12: GRA identificados en los metagenomas agrupados por familias de antibióticos a los que confieren resistencia. En la primera y tercera columna se representan los genes del metagenoma correspondiente a Puñihuil (zona no expuesta a antibióticos) y Quetén (zona expuesta a antibióticos) respectivamente, a la derecha se indica el número de veces que se identificó cada gen.

Puñihuil	3777	Quetén	2109
aminoglucósido	150	aminoglucósido	89
aac_2__I	1	aac_2__I	1
aac_3__I	7	aac_3__I	3
aph_4__I	1	aph_4__I	1
aph_6__I	2	aph_6__I	6
ksgA	75	ksgA	40
streptothricin_acetyltransferase	64	streptothricin_acetyltransferase	36
		AAC(6')	1
		APH(4)	1
bacitracina	568	bacitracina	310
bacA	114	bacA	55
bcrA	453	bcrA	255
macB	1		
betalactámicos	116	betalactámicos	48
AIM-1	1	BES-1	1
fntC	1	CARB-10	1
PBP_1A	56	PBP_1A	22
PBP_1B	1	PBP_1B	1
penA	56	penA	23
TEM-116	1		
		fosfomicina	1
		fosX	1
fosmidomicina	80	fosmidomicina	64
rosA	8	rosA	6
rosB	72	rosB	58
ácido fusídico	12	ácido fusídico	5
fusH	12	fusH	5
MLS	716	MLS	378
Erm(43)	1	lsa	1
ermZ	1	macA	6
macA	30	macB	371
macB	684		
multidroga	805	multidroga	483
emrE	6	AcrS	1
marR	124	cmeB	1
mdtK	135	emrE	6
mepA	67	marR	67
mexH	3	mdtK	90
mexT	99	mdtO	1
multidroga_ABC_transporter	298	mepA	38
multidroga_bcr	20	mexH	3
ompR	1	mexT	83
OprA	4	multidroga_ABC_transporter	147
pmrA	1	multidroga_bcr	14
smeF	1	ompR	3
ToiC	45	OprA	2
ykkD	1	ToiC	27
fenicol	1	fenicol	1
TnSs1	1	cmlB1	1
polimixina	413	polimixina	178
arnA	413	arnA	178
quinolonas	15	quinolonas	20
mfpA	13	arIR	1
AbaQ	1	mfpA	18
emrR	1	QnrB33	1
rifamicina	41	rifamicina	26
ADP_ribosylating_transferase_arr	1	ADP_ribosylating_transferase_arr	1
rifampin_monooxygenase	40	rifampin_monooxygenase	25
sulfonamida	1	sulfonamida	1
sul2	1	sul2	1
tetracenomicina C	1	tetracenomicina C	2
tcmA	1	tcmA	2
tetraciclinas	65	tetraciclinas	29
tet34	39	tet34	20
tetV	3	tetV	1
tetX	23	tetX	8
vancomicina	793	vancomicina	474
vanR	2	vanR	1
vanS	628	vanS	397
vanT	120	vanT	55
vanW	3	vanW	1
vanX	17	vanX	5
vanY	17	vanY	11
vanZ	6	vanZ	4

3.2.5 Abundancia relativa de genes GRA en los metagenomas

Se reclutaron las lecturas correspondientes a las secuencias identificadas como GRA utilizando el programa *Bowtie2*. Luego, mediante el paquete *samtools* se transformó el archivo de salida en un archivo de texto, con este, se procedió a calcular la abundancia relativa de los GRA identificados anteriormente en los metagenomas. Estos datos se normalizaron por el largo del gen y el total de lecturas de cada metagenoma. El resultado de las abundancias relativas se puede apreciar en la figura 8.

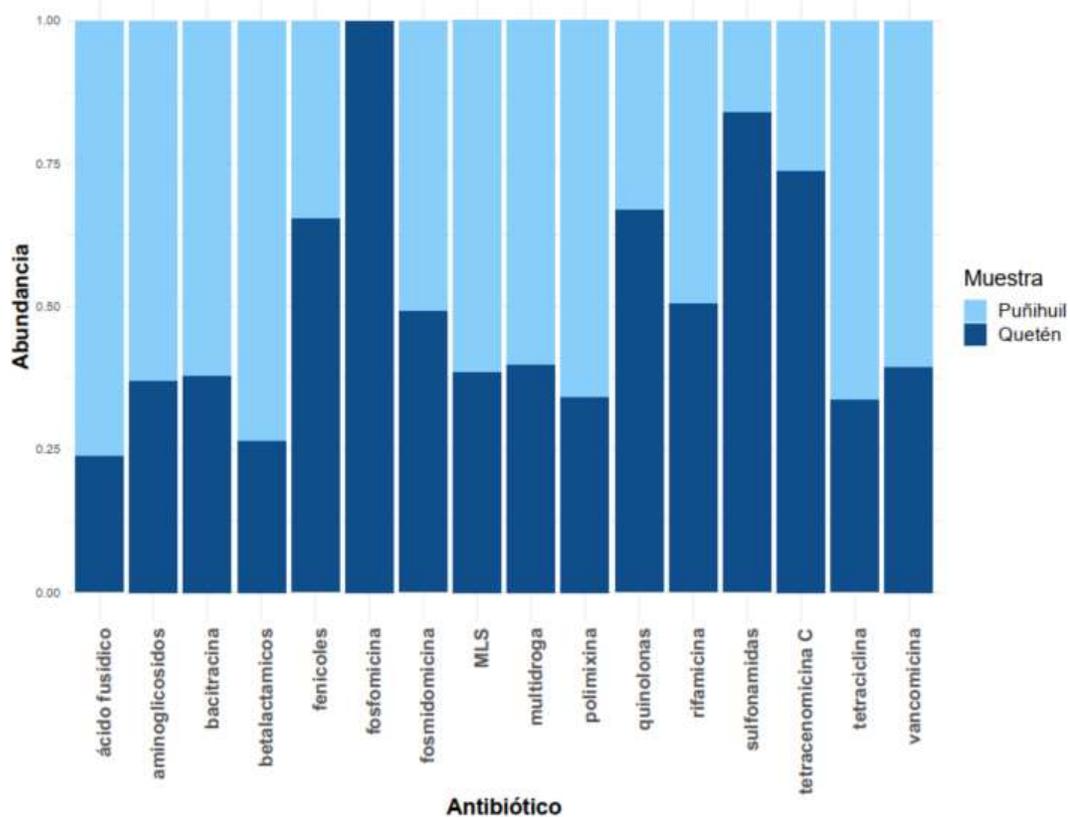


Figura 8: Genes de resistencia a antibióticos (GRA) identificados por SARGFAM y RGI en los metagenomas de Puñihuil y Quetén. Diagrama de barras donde se grafican las proporciones de los GRA identificados mediante SARGFAM y RGI en dos metagenomas marinos correspondiente a una zona no expuesta a antibióticos (Puñihuil) en celeste y otro a una zona expuesta a los antibióticos (Quetén) en azul.

Al comparar las abundancias normalizadas por muestra se puede observar que, en gran parte de las familias de antibióticos identificadas, el metagenoma de Puñihuil tiene más representación de estas familias de genes. Sin embargo, Quetén tiene mayor representación en las familias de fenicoles, quinolonas, sulfonamidas y tetracenicina C. Dos de estas, corresponden a familias de antibióticos utilizados en salmonicultura.

3.2.6 Asignación taxonómica y abundancia relativa de *contigs* que contienen GRA.

A partir de los resultados anteriores se extrajeron los *contigs* de los metagenomas que contenían GRA utilizando el programa *seqtk*. A estas secuencias se les realizó un BLASTn contra la base datos nt de NCBI. El resultado de este proceso se utilizó como archivo de entrada para MEGAN6. Este programa realizó la asignación taxonómica de los *contigs* mediante su algoritmo LCA (*Lowest Common Ancestor*) utilizando el modo *long-reads* y entregó un índice de Shannon (H') para cada nivel taxonómico. En la tabla 13 se puede observar el número de resultados obtenidos para los niveles taxonómicos de dominio, filo, orden y género. Este proceso se realizó para los *contigs* totales de ambas muestras, y por separado para aquellos que contenían GRA.

Debido a las características del algoritmo LCA hay secuencias que no pueden ser asignadas al siguiente nivel taxonómico, por lo que el número de secuencias asignadas va disminuyendo a medida que se avanza en los niveles taxonómicos. En todas las muestras se obtuvieron secuencias que no se asignaron a ningún dominio, y otras que fueron asignadas como organismos no cultivados, virus o eucariontes. Solo se incluyeron aquellas clasificadas en el dominio Bacteria en adelante.

Tabla 13: Número de *contigs* asignados taxonómicamente en los niveles de filo y orden. En la tabla se pueden apreciar el número de *contigs* asignados taxonómicamente para el total de cada sitio, y por separado aquellos que contienen GRA.

Nivel Taxonómico	Puñihuil	H'	Puñihuil GRA	H'	Quetén	H'	Quetén GRA	H'
Bacteria (Dominio)	57210	-	2076	-	34441	-	933	-
Filo	53766	1,714	1865	1,694	33011	1,683	861	1,605
Orden	46898	3,199	1570	3,107	26383	3,737	654	3,927

En el nivel de filo se obtuvieron valores del índice de Shannon (H') mayores en la comunidad completa que respecto a aquellos contigs que sólo contienen GRA. Lo mismo sucede a nivel de orden en la comunidad de Puñihuil. En el nivel orden de Quetén se obtuvo un índice mayor que respecto a la comunidad total, esto apuntaría que en estos casos la comunidad es más diversa que la comunidad total, este índice también resulta ser mayor a los valores obtenidos para Puñihuil, tanto para la comunidad total, como para los *contigs* que contienen GRA.

Con las listas correspondientes a las secuencias asignadas al dominio Bacteria se procedió a realizar el reclutamiento de lecturas para los *contigs* que lograron ser asignados taxonómicamente pertenecientes al dominio Bacteria. Este reclutamiento se realizó utilizando *bowtie2* y el paquete *samtools* para la conversión de los archivos de salida de *bowtie2*. Con ello, se procedió a calcular la abundancia relativa de las taxas asignadas mediante MEGAN en los metagenomas. Para el cálculo se utilizó la formula presentada en la sección materiales y métodos. La cantidad de lecturas se normalizó por el largo del *contig* y el número de lecturas totales con las que se realizaron ambos ensamblajes. El resultado se graficó en R utilizando el paquete *ggplot2*.

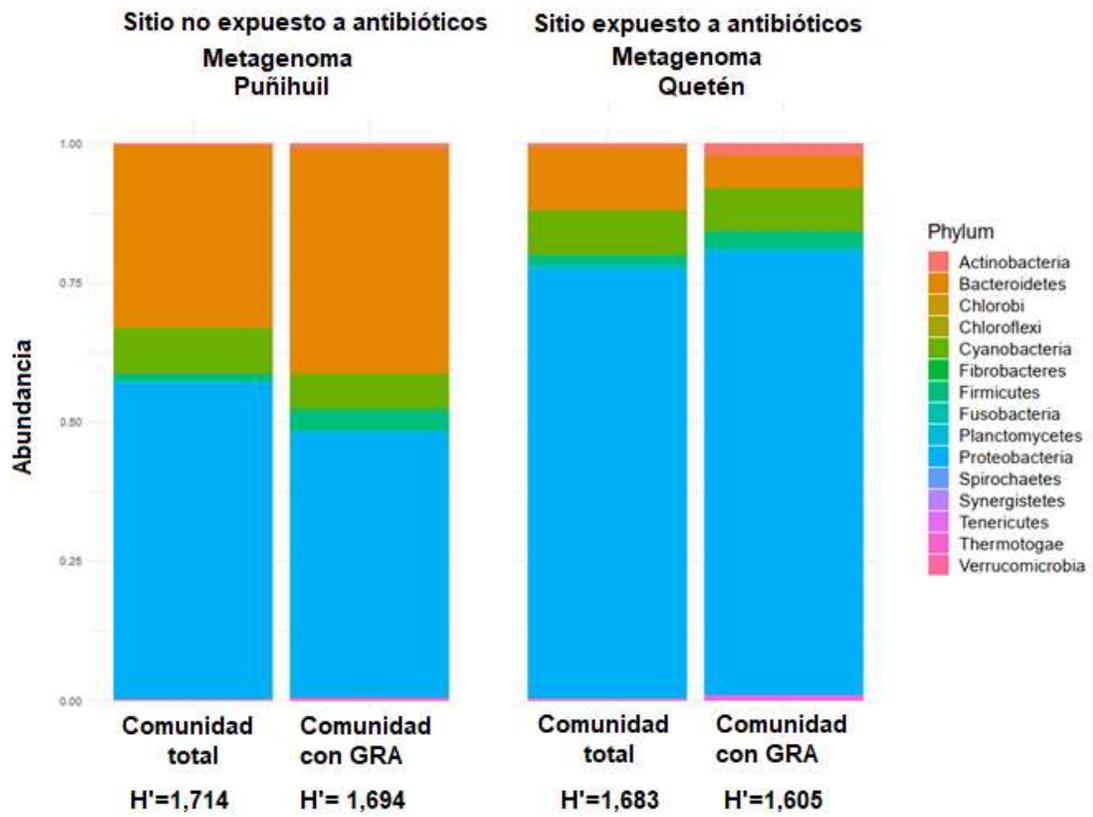


Figura 9: Taxonomía a nivel de Filo obtenido para la comunidad total y aquellos contigs que contenían GRA identificados por SARGFAM y RGI.

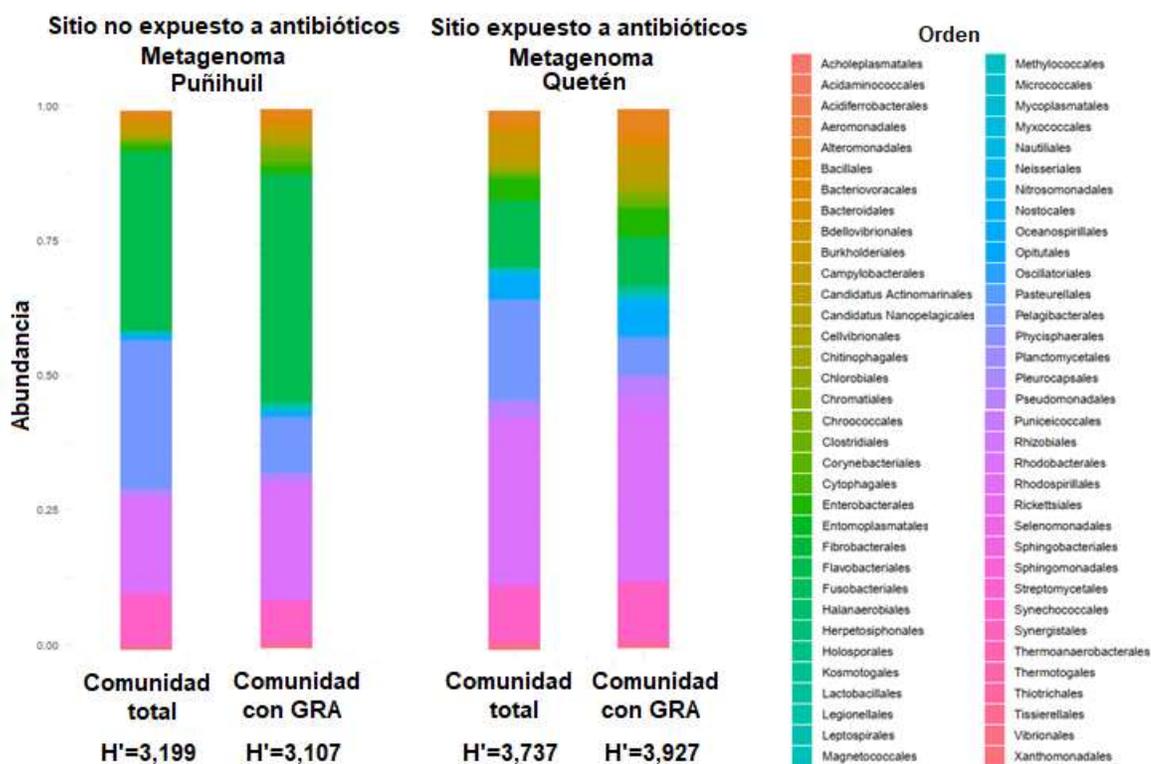


Figura 10. Taxonomía a nivel de Orden obtenido para la comunidad total y aquellos *contigs* que contenían GRA identificados por SARGFAM y RGI

XII. 4. DISCUSIÓN

El descubrimiento de los antibióticos revolucionó la medicina y la forma en que se enfrentan las infecciones bacterianas. Este tipo de sustancias son utilizadas tanto en ambientes clínicos como en distintas industrias del agro, un ejemplo de esto es la industria agropecuaria. En Chile, los antibióticos se administran en el cultivo de salmónidos en Chile para enfrentar distintos brotes infectivos, sin embargo, se utilizan mayoritariamente para erradicar brotes de *Piscirickettsia salmonis* (SERNAPESCA, 2020), agente causante del SRS (septicemia rickettsial salmónida). La administración se realiza por medio de comida medicada, esto genera que la comida no consumida se deposite en el fondo marino o que sea consumida por otras especies que conviven en las zonas de cultivo, provocando la dispersión de estas sustancias (Cabello, 2016). Por otro lado, la absorción intestinal de estos compuestos no es absoluta, y son excretados en las heces contaminando el medio marino en el que se encuentran las zonas de cultivo (Kemper, 2008).

Si bien estos compuestos resultan ser altamente eficaces para combatir los brotes de SRS, a medida que pasa el tiempo y se amplía su uso, el patógeno y las bacterias del ambiente con las que comparte su nicho podrían volverse resistentes. De ello surge la necesidad de describir la respuesta de *P. salmonis* y de las comunidades microbianas que habitan los lugares que se encuentran actualmente expuestos a estas sustancias.

La resistencia antibióticos es un fenómeno que tiene gran importancia biológica, tanto para la salud humana como en los ecosistemas. Entender el origen, evolución y presencia de mecanismos y genes que permiten resistir a antibióticos en distintos ecosistemas podría permitir entender de mejor manera este fenómeno y generar políticas respecto al uso de estos compuestos de forma más segura. Actualmente

existen estudios de este fenómeno en otros ambientes, tanto clínico como naturales (Riesenfeld y cols., 2004; D'Costa y cols., 2006, 2007; Dantas y cols., 2008; Allen y cols., 2010; Donato y cols., 2010; Wright, 2010).

En este sentido, en este trabajo se propuso como objetivo la identificación GRA tanto en el patógeno y su fenotipo de resistencia, como en las comunidades bacterianas expuestas a antibióticos en contraste con comunidades no expuestas. Además, se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la CMI en *P. salmonis* utilizando un medio definido desarrollado en el laboratorio y publicado durante la presentación de este trabajo (Ortiz-Severín y cols., 2021)

4.1. Objetivo 1: Determinar la sensibilidad de diferentes cepas de *P. salmonis* a los antibióticos utilizados en salmonicultura y la detección de GRA contenidos en sus genomas.

Distintos estudios han abarcado el estudio del fenotipo, y últimamente del genotipo, de resistencia a antibióticos del patógeno *P. salmonis*, en particular, para aquellos antibióticos utilizados en salmonicultura.

Al igual que el estudio de Cartes y cols. (2017) en nuestro estudio abarcamos este problema desde una perspectiva genómica y desde una perspectiva fenotípica. En este trabajo se estudiaron los genomas de 4 cepas, dos de referencia (LF-89 y EM-90), y dos aisladas con posterioridad correspondientes a cada genogrupo (LF-89 *like* y EM-90 *like*) y se realizó la búsqueda de GRA mediante dos métodos; uno por homología de secuencias y otro por HMM (modelos ocultos de Markov). *In vitro*, se analizó el fenotipo de estas mismas cepas por medio de pruebas con sensidiscos y determinación de CMI.

Los resultados arrojaron que es posible identificar GRA en todos los genomas de *P. salmonis* analizados y por medio de cualquiera de las dos estrategias. Sin embargo, los resultados obtenidos entre las estrategias de búsqueda no coinciden entre sí, sólo una pequeña parte de estos resultan estar compartidos entre búsquedas. Ello indicaría que los resultados obtenidos por ambos métodos son complementarios entre sí. De los GRA identificados en los genomas de *P. salmonis* cerca de un 60% de estos fueron identificados por HMM utilizando SARGFAM (Yin y cols., 2018) y un 40% por el software RGI, el software de CARD, la base de datos más curada y actualizada de genes de resistencia a antibióticos en la actualidad (Alcock y cols., 2020). Cerca de un 10% de los GRA identificados correspondían a un resultado en común por ambas estrategias. La representatividad de los genes entre las cepas es bastante equivalente, es posible identificar casi los mismos genes en todas las cepas, en algunos casos lo que varía es la cantidad de copias del gen identificado. Por lo tanto, a pesar de la diferencia en genogrupo y año de aislamiento, la cantidad e identidad de GRA es constante para *P. salmonis*. Los GRA identificados en todas las cepas corresponden a distintas familias de antibióticos. Al seleccionar aquellos resultados que correspondían a GRA asociados a los tipos de antibióticos utilizados en la industria acuícola se pudo identificar que estos responden a distintos mecanismos de resistencia; tales como, alteración del blanco, protección del blanco y eflujo del antibiótico en la mayoría de los casos. Lo que era esperable debido a que este es el mecanismo más común en respuesta a la presencia de antibióticos.

En cuanto a la pruebas *in vitro*, en un principio se realizó una prueba utilizando sensidiscos siguiendo un protocolo sugerido por Otterlei y cols (2016) en tres medios distintos de crecimiento. Sin embargo, los resultados obtenidos en agar sangre y en agar

chocolate no resultaron reproducibles y cuantificables, y en la mayoría de los casos no se lograba obtener crecimiento visible de *P. salmonis*. Al cultivar la bacteria en AUSTRAL-SRS se logró la reproducibilidad de los resultados, ya que la bacteria demostró crecer y formar halos en todos los ensayos realizados, a diferencia de los otros medios. Respecto a los antibióticos utilizados actualmente en salmonicultura se obtuvieron resultados que demostraron la sensibilidad de las cuatro cepas a estos, en ningún caso se presentó un fenotipo resistente. En amoxicilina no se logró cuantificar la disminución de crecimiento debido a que no se formaba un halo de inhibición, sólo se podía observar una disminución general del crecimiento. Este ensayo cumplió el objetivo de ser una primera aproximación fenotípica de la respuesta del crecimiento de *P. salmonis* en presencia de antibióticos.

Para determinar una concentración aproximada de inhibición de crecimiento se realizaron ensayos de CMI, este ensayo se realizó en dos medios distintos, AUSTRAL-SRS que es que actualmente sugiere el manual CLSI, y otro que se desarrolló en el laboratorio y se publicó recientemente (Ortiz-Severín y cols., 2021) basado en el modelo metabólico de *P. salmonis* de Cortés y cols (2017). La particularidad de este medio consiste en que este es un medio definido (medio CMMAB) al que además se le realizó el ajuste de cationes divalentes como lo sugiere el manual CLSI para la determinación de CMI en otro patógenos, en cambio, AUSTRAL-SRS es un medio nutritivo que contiene suero fetal bovino entre sus componentes, lo que no permite decir que su composición siempre es igual en cuanto a los metabolitos que disponibles. Respecto a los resultados obtenidos para estos ensayos existen diferencias entre algunos de los rangos de CMI obtenidos para los distintos medios de cultivo, lo que indica que existe una diferencia en la respuesta del patógeno a los antibióticos al ser cultivado en distintas

condiciones nutritivas como se demostró en el trabajo de Ortiz-Severín y cols (2021). Respecto a los valores obtenidos de CMI, las cuatro cepas de *P. salmonis* testeadas en este estudio presentan un fenotipo sensible a los antibióticos utilizados en salmonicultura, por lo que la exposición antibióticos por tratamiento a piscirickettsiosis no ha generado un aumento en la resistencia de las cepas analizadas ni una respuesta distinta durante el tiempo, considerando que dos de las cepas corresponden a aislados más recientes en el tiempo.

Entonces, a pesar de poder identificar GRA en los genomas de las cuatro cepas, ellas no poseen un fenotipo resistente. Como proyección de este trabajo, se propone cuantificar la expresión de los genes identificados para dilucidar si estos se expresan constitutivamente como parte del metabolismo de *P. salmonis*, o si efectivamente se activan en presencia del antibiótico y otorgan algún grado de protección. Se han descrito cepas de *P. salmonis* con fenotipo resistente que podrían servir para responder esto. Además, se presentan los primeros resultados obtenidos utilizando el medio CMMAB para la determinación de CMI en el patógeno *P. salmonis*.

4.2: Objetivo 2: Identificar *in silico* GRA en los metagenomas marinos de zonas expuestas y no expuestas a tratamientos antibióticos.

Además de estudiar la respuesta de *P. salmonis* a los antibióticos se propuso estudiar la presencia de GRA en la comunidad microbiana del ambiente marino expuesto a la administración exógena de antibióticos. Los estudios que se han realizado de la respuesta ambiental a la administración de estos compuestos en salmonicultura se han enfocado principalmente en describir la fracción cultivable. La aproximación propuesta en este estudio es novedosa, ya que se buscó describir el resistoma, es decir, todo el conjunto de GRA contenidos en la fracción piconanoplactonica (D' Costa y cols., 2006).

Aún no existe otro estudio publicado que proponga esta perspectiva del efecto de la administración de antibióticos para el cultivo de salmónidos en Chile. Se han realizado que contrastan zonas intervenidas versus no intervenidas, como el estudio de Shah y cols., (2014) dónde concluyen que los aislados obtenidos desde zonas expuestas a antibióticos presentan niveles de resistencia mayores que otras regiones de cultivo marino en el mundo, y esto se lo atribuyen a la cantidad de antibióticos que se administran en Chile, ya que anteriormente se había descrito en otros estudios que aquellas comunidades microbianas expuestas a antibióticos seleccionan bacterias resistentes a antibióticos (Björklund et al., 1991; Hansen et al., 1992; Herwig and Gray, 1997; Chelossi et al., 2003; Akinbowale et al., 2007; Dang et al., 2009; Hellweger et al., 2011). Sin embargo, el grado de resistencia y la frecuencia de bacterias resistentes a antibióticos obtenidas desde muestras tomadas en territorio de cultivo acuícola en Chile es superior y se relaciona con la cantidad de antibióticos administradas tanto en el pasado como en el presente en estas regiones (Asche et al., 2010; Fernandez-Alarcon et al., 2010; Contreras and Miranda, 2011; Ibieta et al., 2011; Millanao et al., 2011; Cabello et al., 2013). Además, se ha descrito que cepas de *E. coli* obtenidas de urocultivo de ambientes clínicos en regiones de cultivo extensivo de salmónidos comparten GRA con bacterias aisladas desde el ambiente de cultivo de salmónidos (Tomova y cols., 2015). Esto demuestra que el peligro del uso extensivo de antibióticos en salmonicultura tiene consecuencias en la salud humana y que estos genes son potencialmente transferibles a patógenos humanos.

En el presente trabajo, se realizó una toma de muestras en un centro de cultivo de salmónidos en Chiloé. Como muestra control se tomó una muestra de agua en una

región de Chiloé no expuesta a estos compuestos ubicada en la costa Pacífico de la isla grande.

Al recibir las lecturas obtenidas de la secuenciación se realizó un filtro de las secuencias recibidas, esto se debe a que existen lecturas que no tienen el nivel de calidad exigido para la asignación de cada nucleótido, o el total de la lectura contiene muchos elementos repetidos o secuencias de baja complejidad que pueden entorpecer el ensamble. De los genes predichos en cada metagenoma, el 1,84% corresponden a GRA en Puñihuil y 1,27% en Quetén. Estos contienen diversas familias de GRA que responden a distintos tipos de antibióticos. Los antibióticos a los que responden los GRA identificados coincidieron en ambas muestras, sólo en el caso de fosfomicina se identificó un GRA en el metagenoma de Quetén y no en Puñihuil. Las diferencias se vieron la hora de estimar las proporciones en que estos se encuentran representados. En el metagenoma de la región de Quetén, correspondiente a la que se encuentra expuesta a antibióticos se ve una mayor representación de GRA para los antibióticos utilizados por la industria acuícola como lo son los fenicoles y quinolonas. También se ven mayormente representados los GRA a betalactámicos, sulfonamidas y tetracenicina C. En el resto de los antibióticos a los que otorgan resistencia los GRA identificados se encuentran más representados en la zona no expuesta a antibióticos. Esto es posible porque los ambientes naturales son reservorios de este tipo de genes, hay lugares considerados prístinos donde se han podido identificar estos genes, demostrando así que la resistencia a antibióticos es un fenómeno que existe desde antes que como humano utilizáramos estos compuestos para combatir enfermedades.

Respecto a la taxonomía de las comunidades, estas resultaron estar estructuradas de forma distinta en composición al observar sus perfiles obtenidos a partir del cálculo de la

abundancia relativa de los *contigs* que lograron ser asignados taxonómicamente por MEGAN. En cuanto a la diversidad de estas, los índices de Shannon obtenidos a nivel de filo son mayores en el metagenoma de Puñihuil que en el de Quetén. Sin embargo, al analizar los obtenidos a nivel de orden indican que el metagenoma de la comunidad expuesta a antibióticos, Quetén, posee mayor diversidad que la no expuesta. A la hora de evaluar la taxonomía de la comunidad completa contra las taxas de los *contigs* asignados que contenían GRA, sucede que a nivel de orden se obtiene un mayor índice de Shannon en la comunidad que contienen GRA con respecto a la comunidad global, lo que podría indicar que los organismos que contienen estos genes están más diversificados que la comunidad total, y que la administración exógena de antibióticos estaría actuando como una presión selectiva que hace que estos elementos se mantengan en distintos organismos de la comunidad e incluso con mayor diversidad que la comunidad total.

XIII. 5. CONCLUSIONES

A partir del trabajo presentado se puede concluir lo siguiente:

- La estrategia de búsqueda *in silico* de GRA de *P. salmonis*, permitió identificar GRA para los principales antibióticos utilizados en salmonicultura en cuatro cepas del patógeno. Los GRA identificados fueron clasificados en dos grupos, el primer grupo conformado por los GRA de las cepas LF-89 y CGR02, y el segundo por GRA de las cepas EM-90 y PS12201A, correspondiendo estos al genogrupo al que pertenecen.
- El ensayo de sensidiscos reveló que las cuatro cepas de *P. salmonis* utilizadas en este estudio son sensibles a los antibióticos utilizados en salmonicultura. Sin embargo, todas resultan ser menos sensibles a eritromicina, resultado se repitió en ambos ensayos (sensidiscos y CMI)
- Se logró determinar la CMI en un medio definido (CMMAB) de crecimiento para *P. salmonis*, ello podría generar nuevas estandarizaciones de protocolos, ya que el medio actual de crecimiento (AUSTRAL-SRS) es un medio nutritivo suplementado con suero fetal bovino, lo que no permite modificar o conocer la proporción exacta de nutrientes presentes en el medio de cultivo.
- Fue posible identificar GRA en las cuatro cepas de *P. salmonis*, que otorgan resistencia a los antibióticos utilizados en salmonicultura. Sin embargo, a pesar de ello, ninguna de las cepas estudiadas mostró ser fenotípicamente resistente a estos antibióticos.
- Se logró obtener dos metagenomas a partir de las muestras tomadas en una zona expuesta a antibióticos en una zona no expuesta a estos tratamientos y se predijo el resistoma de ambos, identificando una gran cantidad de genes

comunes de resistencia antibióticos, confirmando lo que está documentado respecto a que los ecosistemas son naturalmente reservorios de GRA. Sin embargo, y como esperábamos, al comparar las dos muestras se logró identificar una mayor cantidad de GRA a fenicoles y quinolonas en la región expuesta antibióticos, sugiriendo que la administración de antibióticos puede actuar como una presión selectiva para las bacterias presentes en zonas de salmonicultura.

- Respecto a la taxonomía de las comunidades, al observar los perfiles globales de la asignación taxonómica resultaron estar estructuradas de forma distinta entre sí. Al evaluar los índices de Shannon de la asignación taxonómica de los *contigs* de la comunidad completa contra las tasas de los *contigs* asignados que contenían GRA, en ambos metagenomas no se observan grandes diferencias entre los índices, siempre siendo mayor el índice de diversidad en la comunidad completa, A nivel de orden del metagenoma de Quetén se obtuvo un índice de Shannon mayor que el de la comunidad total, esto indica que en este nivel la diversidad de los organismos que contienen GRA es mayor que la comunidad total, y podría indicar que la administración exógena de antibióticos potencia el intercambio de estos genes a los diversos miembros de la comunidad.
- Es importante seguir monitoreando el resistoma de estas comunidades, ya que existen estudios donde se identifican genes en organismos patógenos de humanos, que están contenidos en el ambiente, lo que indica que estos son potencialmente transferidos. Al ejercer una presión selectiva en estas comunidades, se enriquecen los portadores de estos elementos y aumenta la posibilidad de su transferencia desde organismos no patógenos.

XIV. 6. BIBLIOGRAFÍA

- Akinbowale, O.L., Peng, H., and Barton, M.D. (2007) Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol* 103: 2016–2025.
- Alcock et al. 2020. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 48, D517-D525
- Asche, F., Roll, K. H., Sandvold, H. N., Sørvig, A., and Zhang, D. (2013). Salmon aquaculture: larger companies and increased production. *Aquac. Econ.Manage.* 17, 322–339. doi: 10.1080/13657305.2013.812156
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., *et al.* (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.
- Björklund, H., Bondestam, J., and Bylund, G. (1990). Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms. *Aquaculture* 86, 359–367.
- Bohle, H., Henríquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Bustamante, F., Bustos, P., *et al.* (2017). The genome sequence of an oxytetracycline-resistant isolate of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* harbors a multidrug resistance plasmid. *Genome Announc.* 5:e01571-16. doi: 10.1128/genomeA.01571-16
- Boolchandani, M., D’Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*, 1.
- Buschmann, A. H., Riquelme, V. A., Hernández-González, M. C., Varela, D., Jiménez, J. E., Henríquez, L. A., *et al.* (2006). A review of the impacts of salmonid farming on marine coastal ecosystems in the southeast Pacific. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 1338–1345
- Buschmann, A. H., Tomova, A., López, A., Maldonado, M. A., Henríquez, L. A., Ivanova, L., *et al.* (2012). Salmon aquaculture and antimicrobial resistance in the marine environment. *PLoS One* 7:e42724
- Cabello, F. C. (2004). Antibióticos y acuicultura en Chile: consecuencias para la salud humana y animal. *Rev. Méd. Chile* 132, 1001–1006.
- Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.* 8, 1137–1144.

- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., et al. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environ. Microbiol.* 15, 1917–1942.
- Cartes, C., Isla, A., Lagos, F., Castro, D., Muñoz, M., Yañez, A., et al. (2017). Search and analysis of genes involved in antibiotic resistance in Chilean strains of *Piscirickettsia salmonis*. *J. Fish Dis.* 40, 1025–1039.
- Chelossi, E., Vezzulli, L., Milano, A., Branzoni, M., Fabiano, M., Riccardi, G., and Banat, I.M. (2003) Antibiotic resistance of benthic bacteria in fish-farm and control sediments of the Western Mediterranean. *Aquaculture* 219: 83–97.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*.
- Cortés, M. P., Mendoza, S. N., Travisany, D., Gaete, A., Siegel, A., Cambiazo, V., & Maass, A. (2017). Analysis of *Piscirickettsia salmonis* metabolism using genome-scale reconstruction, modeling, and testing. *Frontiers in microbiology*, 8, 2462.
- Cvitanich JD, Garate NO, Smith CE (1991) The isolation of a rickettsia-like organism causing disease and mortality in Chilean salmonids and its confirmation by Koch's postulate. *J Fish Dis* 14:121–145
- Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A., et al., (2016) World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clinical Infectious Diseases*, 63(8), 1087-1093.
- D'Costa, V. M., Griffiths, E., and Wright, G. D. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 481–489.
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science* 311, 374–377.
- Done, H. Y., Venkatesan, A. K., and Halden, R. U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture? *AAPS J.* 17, 513–524
- Dang, H., Ren, J., Song, L., Sun, S., and An, L. (2008). Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 209–217
- Dang, H., Zhao, J., Song, L., Chen, M., & Chang, Y. (2009). Molecular characterizations of chloramphenicol- and oxytetracycline-resistant bacteria and resistance genes in mariculture waters of China. *Marine pollution bulletin*, 58(7), 987-994.

- Done, H. Y., Venkatesan, A. K., & Halden, R. U. (2015). Does the recent growth of aquaculture create antibiotic resistance threats different from those associated with land animal production in agriculture?. *The AAPS journal*, 17(3), 513-524.
- De Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., *et al.*, (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237), 1261605
- Eddy, S. R. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(9), 755-763.
- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture. Disponible en: <http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
- Fernández-Alarcón, C., Miranda, C. D., Singer, R. S., Lopez, Y., Rojas, R., Bello, H., *et al.* (2010). Detection of the floR gene in a diversity of florfenicol resistant gram-negative bacilli from freshwater salmon farms in Chile. *Zoonoses Public Health* 57, 181–188.
- Finn, R. D., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., *et al.*, Salazar, G. A. (2015). The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*, 44(1), 279-285.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16(1), 1-7.
- Hellweger, F.L., Ruan, X., and Sanchez, S. (2011) A simple model of tetracycline antibiotic resistance in the aquatic environment (with application to the Poudre River). *Int J Environ Res Public Health* 8: 480–497.
- Henríquez, P., Bohle, H., Bustamante, F., Bustos, P., and Mancilla, M. (2015). Polymorphism in gyrA is associated to quinolones resistance in Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J. Fish Dis.* 38, 415–418.
- Henríquez, P., Kaiser, M., Bohle, H., Bustos, P., and Mancilla, M. (2016). Comprehensive antibiotic susceptibility profiling of Chilean *Piscirickettsia salmonis* field isolates. *J. Fish Dis.* 39, 441–448
- Henríquez-Núñez, H., Evrard, O., Kronvall, G., and Avendaño-Herrera, R. (2012). Antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated in Chile. *Aquaculture* 354, 38–44
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., and Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1248–1253.
- Herwig, R. P., Gray, J. P., and Weston, D. P. (1997). Antibacterial resistant bacteria in surficial sediments near salmon net-cage farms in Puget Sound, Washington. *Aquaculture* 149, 263–283

- Hollis, A., and Ahmed, Z. (2014). The path of least resistance: paying for antibiotics in non-human uses. *Health Policy* 118, 264–270.
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11(1), 119.
- Ibieta, P., Tapia, V., Venegas, C., Hausdorf, M., and Takle, H. (2011) Chilean salmon farming on the horizon of sustainability: Review of the development of a highly intensive production, the ISA crisis and implemented actions to reconstruct a more sustainable aquaculture industry. In *Aquaculture and the Environment – a Shared Destiny*. Sladonja, B. (ed.). Rijeka, Croatia: INTECH, pp. 215–246.
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3), 299-314.
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Mandakovic D., Glasner B., Maldonado J., Aravena P., González M., Cambiazo V. & Pulgar R. (2016) Genomic- based restriction enzyme selection for specific detection of *Piscirickettsia salmonis* by 16S rDNA PCR-RFLP. *Frontiers in Microbiology* 9, 643. doi:10.3389/fmicb.2016.00643.
- Mauel, M. J., Giovannoni, S. J., & Fryer, J. L. (1999). Phylogenetic analysis of *Piscirickettsia salmonis* by 16S, internal transcribed spacer (ITS) and 23S ribosomal DNA sequencing. *Diseases of aquatic organisms*, 35(2), 115-123.
- Millanao, B., Arrientos, H., Gomez, C., Tomova, A., Buschmann, A.H., Dölz, H., and Cabello, F.C. (2011) Uso inadecuado y excesivo de antibioticos: salud publica y salmonicultura en Chile [Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon aquaculture in Chile]. *Rev Med Chile* 139: 107–118
- Mikheenko, A., Saveliev, V., & Gurevich, A. (2016). MetaQUAST: evaluation of metagenome assemblies. *Bioinformatics*, 32(7), 1088-1090.
- Miranda, C. D. (2012). “Antimicrobial resistance associated with salmonid farming,” in *Antimicrobial Resistance in the Environment*, eds P. L. Keen and M. H. H. M. Montforts (Hoboken, NJ:Wiley-Blackwell), 423–451
- Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., and Roberts, M. C. (2003). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 883–888.

- Miranda, C. D., and Rojas, R. (2007). Occurrence of florfenicol resistance in bacteria associated with two Chilean salmon farms with different history of antibacterial usage. *Aquaculture* 266, 39–46.
- Miranda, C. D., Smith, P., Rojas, R., Contreras-Lynch, S., and Vega, J. A. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Flavobacterium psychrophilum* from Chilean salmon farms and their epidemiological cut-off values using agar dilution and disk diffusion methods. *Front. Microbiol.* 7:1880
- Miranda, C. D., and Zemelman, R. (2002a). Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Sci. Total Environ.* 293, 207–218
- Miranda, C. D., and Zemelman, R. (2002b). Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture* 212, 31–47
- Miranda, C. D., Godoy, F. A., & Lee, M. R. (2018). Current status of the use of antibiotics and the antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1284.
- Muziasari, W. I., Pitkänen, L. K., Sørum, H., Stedtfeld, R. D., Tiedje, J. M., and Virta, M. (2017). The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below Baltic Sea fish farms. *Front. Microbiol.* 7:2137
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824-834.
- Ortiz-Severín, J., Stuardo, C. J., Jiménez, N., Palma, R., Cortés, M. P., Maldonado, J., *et al.* Nutrient scarcity in a new defined medium reveals metabolic resistance to antibiotics in the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Frontiers in Microbiology*, 2973.
- Otterlei, A., Brevik, Ø. J., Jensen, D., Duesund, H., Sommerset, I., Frost, P., *et al.* (2016). Phenotypic and genetic characterization of *Piscirickettsia salmonis* from Chilean and Canadian salmonids. *BMC veterinary research*, 12(1), 55.
- Poppe, T. T., Barnes, A. C., and Midtlyng, P. J. (2002). Welfare and ethics in fish farming. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 22, 148–151.
- Pulgar R, Travisany D, Zuñiga A, Maass A, Cambiazo V. 2015. Complete genome sequence of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *J Biotechnol* 212:30–31.
- Quesada, S. P., Paschoal, J. A. R., and Reyes, F. G. R. (2013). Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones—A review. *J. Food Sci.* 78, R1321–R1333.
- Riesenfeld, C. S., Goodman, R. M., and Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* 6, 981–989.

- Rozas, M., and Enríquez, R. (2014). Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *J. Fish Dis.* 37, 163–188.
- SERNAPESCA (2019). Informe Sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2018. Valparaíso. Disponible en: <http://www.sernapesca.cl>
- SERNAPESCA (2020). Informe Sobre Uso de Antimicrobianos en la Salmonicultura Nacional 2020. Valparaíso. Disponible en: <http://www.sernapesca.cl>
- Shah, S. Q., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., *et al.* (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non- aquaculture sites. *Environ. Microbiol.* 16, 1310–1320.
- Smith, P. A., Vecchiola, I. M., Oyanedel, S., Garcés, L. H., Larenas, J., and Contreras, J. (1996). Antimicrobial sensitivity of four isolates of *Piscirickettsia salmonis*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 16, 164–168
- Smith, P. (2008). Antimicrobial resistance in aquaculture. *Rev. Sci. Tech.* 27, 243–264.
- Spencer, S. J., Tamminen, M. V., Preheim, S. P., Guo, M. T., Briggs, A. W., Brito, I. L., *et al.*, (2016). Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *The ISME journal*, 10(2), 427.
- Suzuki, S., Makihara, N., Kadoya, A., 2018. Tetracycline resistance gene tet(M) of a marine bacterial strain is not accumulated in bivalves from seawater in clam tank experiment and mussel monitoring. *Sci. Total Environ.* 634, 181–187.
- Tillett, D., & Neilan, B. A. (2000). Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 36(1), 251-258.
- Tomova, A., Ivanova, L., Buschmann, A. H., Rioseco, M. L., Kalsi, R. K., Godfrey, H. P., *et al.* (2015). Antimicrobial resistance genes in marine bacteria and human uropathogenic *Escherichia coli* from a region of intensive aquaculture. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 803–809.
- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., *et al.* (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13257–13263
- Wheeler, D. L., Barrett, T., Benson, D. A., Bryant, S. H., Canese, K., Chetvermin, V., ... & Feolo, M. (2007). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D13-D21.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. springer.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 175–186

Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 589–594.

Yang, J., Wang, C., Shu, C., Liu, L., Geng, J., Hu, S., et al. (2013). Marine sediment bacteria harbor antibiotic resistance genes highly similar to those found in human pathogens. *Microb. Ecol.* 65, 975–981

Yañez A., Valenzuela K., Silva H., Retamales J., Romero A., Enriquez R., Figueroa J., Claude A., González J., Avendaño-Herrera R. & Carcamo J. (2012) Broth medium for the successful culture of the fish pathogen *P. salmonis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 97, 197–205.

Yañez A., Valenzuela K., Matzner C., Olavarría V., Figueroa J., Avendaño-Herrera R. & Carcamo J. (2014) Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. *Journal of Fish Diseases* 37, 505–509

Yin, X., Jiang, X. T., Chai, B., Li, L., Yang, Y., Cole, J. R., ... & Zhang, T. (2018). ARGs-OAP v2.0 with an expanded SARG database and Hidden Markov Models for enhancement characterization and quantification of antibiotic resistance genes in environmental metagenomes. *Bioinformatics*, 34(13), 2263-2270.

World Health Organization (2016). WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food: Report of a WHO Consultation with the Participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties. Geneva: World Health Organization. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/containment-amr/en>