

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



**“IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE AISLADOS
BACTERIANOS DEL GÉNERO *VIBRIO* OBTENIDOS DESDE
MUESTRAS AMBIENTALES DEL SUR DE CHILE, A TRAVÉS DE
UNA GENOTIPIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE SUS
GENOMAS”**

Seminario de Título para optar al grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular

DANIEL ANDRÉS ARANEDA REVECO

Director de Seminario: Dr. Roberto Bastías Romo

Profesor patrocinante: Dr. Michael Handford

Santiago - Chile

Octubre 2022

BIOGRAFÍA



Me llamo Daniel Andrés Araneda Reveco, nací el 15 de julio de 1996 en el hospital San Borja de Santiago. Mi madre se llama Soledad Reveco Puelma y mi padre Juan Araneda Cifuentes. Por mi papá, tengo dos hermanas menores; Rayen y Aylen. Soy bullanguero desde que nací. Crecí al sur de la capital en la comuna de La Pintana, donde comencé mi educación básica en el Colegio Iberoamericano, institución en la que estuve hasta 6to básico. Luego, ingresé al Instituto Nacional José Miguel Carrera completando el resto de la etapa escolar. Durante los años de educación media, me vi involucrado en diversas manifestaciones por el derecho a la educación y tantos otros derechos sociales. Esto forjó en mí un espíritu de lucha en contra de las injusticias del sistema que perdura hasta hoy. Fue una etapa de crecimiento personal y donde conocí a gran parte de mis amistades. Mi interés por la biología comenzó durante los años de educación básica y una vez terminado el colegio, entré a estudiar la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Durante estos años, participé en diversas instancias dentro y fuera de la academia. En especial, destaco la participación en la competencia internacional de biología sintética IGEM 2018 la cual se desarrolló en Boston, MA. En esta instancia participé como miembro del equipo Uchile_Biotec presentando el proyecto “Tenzyme Vilu”, el que buscó modernizar los sistemas de detección de la molécula Saxitoxina, toxina paralizante presente en varios eventos de marea roja. Obtuvimos medalla de bronce, siendo el primer equipo chileno en lograrlo. Luego de pensar en qué área quería desempeñarme, contacté al Dr. Roberto Bastías para integrarme a su equipo de trabajo en el grupo de Bacteriófagos e Interacciones Microbianas de la PUCV.

Y bueno, después de un estallido social y una pandemia, terminé este largo proceso. Si bien hubo tropezones y errores, impulsivos, torpes y no forzados, de todo se aprende y eso es lo lindo de la vida. Enfrentaré los desafíos que vienen e intentaré lograr mis objetivos con la convicción de que el individualismo debe dar paso a la solidaridad para poder desarrollarnos en plenitud y alcanzar la felicidad.

A mi familia por toda la paciencia y apoyo incondicional

A mi Padre, Abuelas y Abuelos por su amor infinito

Y en especial a mi Mamá, mi mayor pilar

AGRADECIMIENTOS

Decir que fue un camino largo y difícil, lleno de desafíos, donde me equivoqué incontables veces y aprendí con cada una de ellas. Desde que comencé este proceso siempre tuve el apoyo incondicional de mi familia, a la que le debo mucho de lo logrado. Con especial cariño le agradezco a mis abuelos por todo lo que me han entregado; mi tata Héctor y mi lela Isabel que siempre estuvieron ahí para apoyarme y enseñarme cosas, a mi tata Zenen que siempre me hizo sentir el calor de un hogar y el cariño del sur, y a mi mamita Ida, que donde sea que esté me cuida y guía en mi camino. También, agradezco a mi papá por apoyarme siempre y por los consejos en esos momentos donde la terquedad era mi principal característica. Hay mucha gente a la que le agradezco por estar a mi lado, mi madrina y padrino, mis tíos y tías, primos, entre otros. En especial, me gustaría agradecer a mi mamá, la persona más influyente para mí y que siempre ha estado al lado mío apoyándome, guiándome y dándome todo lo que necesite para poder ser feliz. Es imposible dimensionar todo lo que le debo a ella, quien siempre me puso en primer lugar y defendió frente a todo. Quién soy, es en gran parte gracias a mi mamá y le estaré agradecido por toda la vida. También, quiero agradecer a los distintos profesores y profesoras que he tenido. A la profesora Verónica Retamales, quien me incentivó el pensamiento crítico en mis primeros años de colegio. Al profesor Sergio Muñoz, a quién recordaré siempre como uno de los mejores docentes que he tenido. Agradezco al Dr. Francisco Chávez por introducirme en el mundo microbiano y al de la biología sintética. Y, en especial, agradezco al Dr. Roberto Bastías, por guiarme en todo este proceso y ser referente de la rigurosidad a la que quiero llegar como científico. También, quiero agradecer al grupo de Bacteriófagos e Interacciones Microbianas (BIM) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, por la acogida y el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este trabajo de titulación. Por último, ¿qué sería de este proceso sin amigxs? aquellos que estuvieron conmigo en tantas tardes de estudio y no tan estudio. Cómo olvidar todas las andadas y trasnochadas de rumba. Detallaría lo que siento por ustedes, pero sería una tarea de nunca terminar y siento que no sería la mejor forma de agradecerles.

Nada más que agregar, me siento agradecido y honrado de que me compartan parte de su vida.

ÍNDICE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Características generales del género <i>Vibrio</i>.....	1
1.2. Historia de los estudios en <i>Vibrios</i>	1
1.3. Efectos ambientales determinantes en vibrios	2
1.4. Patogenicidad	4
1.5. Genética del género <i>Vibrio</i>	5
1.6. Vibrios en Chile	7
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo General	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Obtención de cepas bacterianas	10
3.2. Extracción y purificación ADN bacteriano	11
3.3. Amplificación gen <i>ARNr 16S</i>	12
3.4. Digestión productos PCR	12
3.5. Ensamble de los genomas	13
3.6. Análisis de secuencias multilocus (MLSA) e identificación de especie.....	14
3.7. Identificación y anotación de elementos de interés	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Extracción de ADN genómico	17
4.2. Amplificación gen <i>16S ARNr</i>	18
4.3. Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)	18
4.4. Secuenciación y análisis genómico	22
4.5. Ensamble genomas bacterianos	23
4.6. Análisis multilocus de secuencias (MLSA) e identificación de especie	24

4.7. Anotación de factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos y profagos presentes en los genomas bacterianos.....	28
5. DISCUSIÓN	37
6. CONCLUSIONES	43
7. BIBLIOGRAFÍA	44
8 ANEXOS	67

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1: Lista de aislados de vibrios provenientes de muestras ambientales considerados en el estudio.....	10
Tabla 2: Genomas de vibrios utilizados para realizar el ensamble a la referencia. Se utilizó las secuencias del cromosoma uno y dos de las especies de <i>Vibrio</i> señaladas	14
Tabla 3: Concentración y pureza del ADN genómico extraído de los aislados ambientales secuenciados	17
Tabla 4: Grupos determinados por la técnica ARDRA según el ribotipo obtenido para cada endonucleasa utilizada	20
Tabla 5: Grupos determinados por la técnica ARDRA según el ribotipo de la digestión del gen 16S ARNr por las enzimas de restricción <i>HhaI</i> , <i>HinfI</i> y <i>mspI</i>	21
Tabla 6: Resultados de la secuenciación de los genomas entregados por la empresa BGI.....	22
Tabla 7: Estadísticas del ensamble de los genomas de los aislados de vibrios secuenciados.....	24
Tabla 8: Información genes constitutivos utilizados para realizar el MLSA	24
Tabla 9: Resultados de la identificación de especies obtenidos con la herramienta SpeciesFinder de CGE	27
Tabla 10: Resultados de la identificación de especies obtenidos mediante la técnica ANI	27
Tabla 11: Comparación entre métodos utilizados para la identificación de las especies de <i>Vibrio</i> correspondientes a los distintos aislados	28
Tabla 12: Estadísticas de las características genómicas de los aislados secuenciados obtenidos de la anotación por RASTk	29
Tabla 13: Presencia de genes de resistencia a antibióticos en los genomas secuenciados.....	34
Tabla 14: Profagos presentes en los genomas de los aislados secuenciados	35

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de las extracciones de ADN genómico	17
Figura 2. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR	18
Figura 3. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de la digestión del producto amplificado del gen <i>16S ARNr</i>	19
Figura 4. Dendrograma obtenido integrando la digestión realizada por las tres endonucleasas.....	21
Figura 5. Distribución de la cantidad de lecturas post-procesamiento en función del Qscore.....	22
Figura 6. Dendrograma obtenido del MLSA	26
Figura 7. Cantidad de elementos genómicos identificados en cada aislado agrupados según su funcionalidad	30
Figura 8. Grafica comparativa de la cantidad de elementos asociados a distintos factores de virulencia presente en los genomas de los aislados vibrios de este estudio	31
Figura 9. Grafica comparativa de la cantidad de elementos asociados a toxinas y superantígenos, integrones, islas de patogenicidad y elementos transposables presentes en los genomas de los aislados secuenciados	33
Figura 10. Alineamiento de las regiones identificadas como profagos con su fago más probable.....	36

LISTA ABREVIATURAS

AMS – Agar Manitol-Sal

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ANI – Identidad promedio de nucleótidos (Average Nucleotide Identity)

ARN – Ácido ribonucleico

LB – Luria-Bertani

MLSA – Análisis de secuencias multilocus (Multilocus Sequence Analysis)

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction)

SST - Temperatura de la superficie del mar (Surface Sea Temperature)

UV - Ultravioleta

RESUMEN

Las bacterias del género *Vibrio* son abundantes y diversas, habitando prácticamente todos los ecosistemas marinos. Se han descrito más de 120 especies, muchas de ellas patógenas para los humanos y otras para animales. Debido al impacto que pueden tener estas bacterias en la salud de la población y de los cultivos comerciales (mariscos, peces, entre otros), su estudio es de gran interés para las autoridades e investigadores.

El objetivo de este trabajo es la identificación y clasificación de 17 aislados ambientales de bacterias del género *Vibrio*, a través de una genotipificación, secuenciación y posterior análisis bioinformático de sus genomas.

Las bacterias fueron aisladas desde agua de mar y tejido blando de choritos (*Mytilus chilensis*) provenientes de las costas de Quillaipe (Puerto Montt, Chile). Luego de extraer el ADN genómico y amplificar el gen *ARNr 16S*, se utilizaron las endonucleasas *HhaI*, *HinfI* y *MspI* para digerir los productos amplificados del gen y, así, obtener un patrón de restricción característico con el cual se elaboró un dendrograma. El dendrograma resultante determinó seis grupos o ribotipos distintos entre los 17 aislados. Se secuenció el genoma de un representante de cada grupo, excepto por el grupo cuatro donde se secuenció el genoma de dos aislados debido a que provenían de distinto origen.

El tamaño de los genomas obtenidos con el ensamble de las lecturas varía entre los 5 y 6,2 millones de pares de bases. Además, los ensamblajes presentan una calidad adecuada según los parámetros N50, N75, L50, L75. Esto sugiere que los ensamblajes son adecuados para los análisis posteriores.

Se realizó un análisis de secuencias multilocus (MLSA, por su sigla en inglés) con los genes constitutivos *ftsZ*, *gnd*, *gyrB*, *metG*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* y *pyrC* para determinar las relaciones taxonómicas y determinar la identidad de la especie de los aislados de vibrios secuenciados. El resultado del MLSA indica que los aislados M3AB11 y M3AB5 pertenecen a la especie *Vibrio pacinii* del clado *pacinii*, mientras que el aislado M3AB8 pertenece a la especie *Vibrio cyclitrophicus* del clado *splendidus*. Por su parte, los aislados M1AB29, P1B4 y M1AB15 pertenecen a las especies *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio jasicida* y *Vibrio diabolicus*, respectivamente, las tres pertenecientes al clado *harveyi*. Se observó que el dendrograma elaborado presenta valores de bootstrap cercanos a 100, indicando gran robustez y fiabilidad

de los nodos formados. El puntaje de fiabilidad para el MLSA realizado con el método de neighbor-joining es de 0,78. Como análisis secundario, se usó la herramienta SpeciesFinder y el método ANI para corroborar la identidad de las especies de vibrios. Si bien hubo discrepancia en la identificación de la especie del aislado M1AB15, esto pudo deberse a la gran similitud que hay entre especies del clado harveyi y a diferencias en los marcadores genómicos utilizados para comparar la similitud entre las especies. El valor orthoANI de los genomas de los aislados comparado con el de la especie determinada por el MLSA es superior a 95%, valor que se ha descrito como umbral para determinar una especie del género *Vibrio* mediante este método. Esto apoya la clasificación realizada por el análisis multi locus.

Por último, la anotación de los genomas indica la presencia de genes asociados a diversas funciones, entre las que destacan división y ciclo celular, transporte celular, respuesta a estrés, metabolismo de diversas moléculas, entre otras funciones necesarias para la supervivencia. Además, el análisis determinó que los seis aislados secuenciados presentan genes asociados a factores de virulencia y genes de resistencia a compuestos antimicrobianos, además de la presencia de profagos. Es necesario realizar ensayos experimentales para determinar si el fenotipo de estos aislados expresa estas características y en qué condiciones lo hacen.

Estos son los primeros casos de *Vibrio pacinii* y *Vibrio jasicida* provenientes de muestras ambientales que son reportados en Chile. El análisis realizado permitió identificar y clasificar distintas bacterias del género *Vibrio* revelando la presencia de nuevas especies potencialmente virulentas en el país.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales del género *Vibrio*

El género bacteriano *Vibrio* es uno de los más diversos y abundantes en los ecosistemas marinos, estando presente tanto en zonas marinas de alta profundidad como en costas y, desde lugares de temperaturas bajas hasta en zonas de aguas templadas (Thompson *et al.*, 2004). Estas bacterias son uno de los grupos cultivables predominantes en laboratorios (Cavallo & Stabili, 2002; Liu *et al.*, 2013), y a la fecha, se han descrito más de 120 especies en este género (Sawabe *et al.*, 2013). Muchas de estas especies son patógenas para humanos y animales, pudiendo producir síndromes de importancia clínica en humanos como gastroenteritis, infecciones en heridas, problemas en la piel y septicemia (Austin, 2005). Las bacterias de este género son Gram negativas, pertenecen a la clase de las gamma-proteobacterias y a la familia de las enterobacterias. En general, las bacterias de este género presentan dos cromosomas circulares siendo uno de mayor tamaño que el otro (Okada *et al.*, 2005). Estas bacterias pueden vivir como células que hacen *swimming* libremente, formando biopelículas o asociándose con otros organismos, pudiendo relacionarse de forma simbiótica o actuando como patógenos (Grimes *et al.*, 2009; Arunkumar *et al.*, 2020). Además, abundan en los sistemas digestivos de diversos animales de importancia comercial tales como peces y moluscos (Davis *et al.*, 1981; Adeleye *et al.*, 2010; Eyisi *et al.*, 2013). Otro aspecto importante es que las bacterias del género *Vibrio* cumplen un rol importante en los ciclos biogeoquímicos, tales como el consumo de carbono, biotransformación y procesos de remineralización, siendo de importancia para la ecología de los ecosistemas que habitan (Svitol *et al.*, 1997; Sherr & Sherr, 2000; Riemann & Azam, 2002; Suginta *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004).

1.2. Historia de los estudios en *Vibrios*

En 1854, el italiano Filippo Pacini (1812-1883) descubrió la primera especie de *Vibrio* mientras estudiaba brotes de cólera en Florencia (Pacini, 1854). Pacini examinó la mucosa intestinal de víctimas fatales de cólera mediante el uso de microscopio y detectó la presencia de la bacteria *V. cholerae* en todas las muestras. Él propuso que la cólera era una enfermedad contagiosa pero la mayoría de los científicos de esa época creía en la teoría miasmática, la

cual propone que la enfermedad era causada por contaminación y aires pestilentes, por lo que su postulado no fue tomado en cuenta de inmediato. Según los estudios del epidemiólogo John Snow, la cólera mató a decenas de miles de personas en Inglaterra entre 1830 y 1854, siendo propagada por una especie de “veneno” que se encontraba en las aguas contaminadas (Snow, 1855). Aproximadamente tres décadas después, el científico Robert Koch obtuvo cultivos de *V. cholera* en placas de gelatina. Él y su equipo de investigadores fueron a Egipto donde un brote de cólera había matado a aproximadamente 100.000 personas y, posteriormente, a la India, donde logró obtener cultivos puros de *V. cholerae*, describiendo las primeras características de esta bacteria y concluyendo que este organismo era el agente causante de la enfermedad de la cólera. Además de *V. cholerae*, el equipo de Koch reportó que existían otras formas de vibrios las cuales eran no patogénicas (Brock, 1999). A finales de la década de 1880, el microbiólogo alemán Martinus Beijerinck aisló las primeras especies de vibrios no patogénicas desde ambientes acuáticos (Beijerinck, 1886). Desde finales del siglo XVIII hasta la fecha se han estudiado y descrito más de 120 especies de vibrios, como por ejemplo *V. fischeri*, *V. splendidus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, entre muchas otras. Además, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías se ha podido aumentar la capacidad de análisis, por lo que la cantidad de datos y estudios acerca de bacterias del género *Vibrio* ha aumentado drásticamente.

1.3. Factores ambientales determinantes en vibrios

Los factores que determinan la presencia y proliferación de estas bacterias son múltiples y complejos (Vezulli *et al.*, 2015), sin embargo, el calentamiento global se posiciona como uno de los factores más incidentes en la expansión de estas bacterias (Kaspar & Tamplin, 1993; Julie *et al.*, 2010; Whitaker *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2012; Vezulli *et al.*, 2013). Pese a que el cambio de la temperatura de la superficie del mar (SST) es considerado el factor con impacto más severo en los ecosistemas costeros (Baker-Austin, 2013), hay pocos estudios que determinan sistemáticamente el rol del calentamiento global en la abundancia, diversidad y en los perfiles genómicos de las bacterias del género *Vibrio*.

Se han reportado varias características que le dan a los vibrios la capacidad para responder a cambios ambientales, convirtiéndose en una potencial herramienta para determinar el estado de los ecosistemas donde habitan (Vezulli *et al.*, 2016). Entre estas características están su

termo sensibilidad, creciendo bien sobre los 15°C y observándose brotes de casos en los meses cálidos del verano, y su rápido tiempo de replicación (algunas llegan a replicarse cada 8-9 minutos), lo que hace de este grupo uno de los más adaptables (Vezulli *et al.*, 2016; Baker-Austin, 2017). El aumento de la SST también puede tener efectos indirectos en el crecimiento de vibrios; la temperatura es uno de los factores que determina el crecimiento del fitoplancton y de plantas acuáticas, alterando la concentración de O₂ y CO₂ disueltos, alterando el pH y favoreciendo el crecimiento de especies como *V. cholerae* por sobre otros organismos (Vezulli *et al.*, 2012). Además de la temperatura, la salinidad, pH y las condiciones del agua (profundidad, O₂ disueltos y turbiedad), hay otros factores bióticos y abióticos que determinan la conformación de comunidades bacterianas de vibrios (Cockburn & James, 1960; Lipp *et al.*, 2002). Entre estos factores se encuentra la disponibilidad de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos (por ejemplo, amonio, nitratos, fosfatos, silicatos y carbono orgánico), de pigmentos (por ejemplo, la clorofila alfa), la presencia de organismos como virus y protozoos que puedan depredar estas bacterias y, la abundancia de otros organismos que puedan servir como hospederos de estas bacterias (por ejemplo, algas, moluscos, peces, entre otros) (Takemura *et al.*, 2014; Siboni *et al.*, 2016; Davis *et al.*, 2017; Kopprio *et al.*, 2017; Kauffman *et al.*, 2018). Si bien los factores más determinantes en la abundancia de vibrios son la temperatura y salinidad, hay otros parámetros como el carbono orgánico disueltos (DOC por sus siglas en inglés) que son de gran importancia en la ecología de estas bacterias. Las partículas DOC son capaces de proveer gran parte de los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias del género *Vibrio* que viven en ambientes marinos (Takemura *et al.*, 2014). Además de la tasa de crecimiento, la SST afecta la cultivabilidad, antigenicidad y patogenicidad (Vezulli *et al.*, 2015). En los meses de invierno, cuando la temperatura es menor al rango de crecimiento preferente, los vibrios pueden entrar a un estado de dormancia llamado “viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés)” (Colwell, 2000; Coutard *et al.*, 2007). Se han descrito otros factores que pueden inducir este estado, tales como la disponibilidad de nutrientes, concentración de oxígeno, de metales pesados e incluso la exposición a la luz del sol (Oliver, 2010). Los estudios sobre el estado VBNC señalan que estas bacterias son metabólicamente activas, siguen siendo potencialmente patógenas, pero no se desarrollan de manera normal en los medios de cultivo tradicionales (Oliver, 2005). También se ha descrito que la temperatura es un factor que

puede determinar la conversión de serotipos entre las especies (Oliver, 2010). Además, los bacteriófagos pueden ejercer una presión selectiva sobre su hospedero, facilitando la diversificación de las comunidades bacterianas e, incluso, alterando la virulencia de las bacterias que son resistentes al bacteriófago (Brockhurst *et al.*, 2005; Middelboe *et al.*, 2009; León & Bastías, 2015; León *et al.*, 2019). La diversidad y abundancia de bacteriófagos es un factor importante en el amoldamiento de las comunidades microbianas (Chevallereau *et al.*, 2022).

1.4. Patogenicidad

Este grupo es uno de los causantes de la mayor cantidad de infecciones en humanos por bacterias marinas a nivel mundial (Baker-Austin *et al.*, 2018), pero el seguimiento de los casos de vibriosis (infección causada por vibrios) se ha visto limitado por los sistemas de vigilancia y detección. Estos sistemas fallan en el reporte de casos de infecciones frecuentemente, presentando diferentes metodologías de medición y careciendo de un sistema estandarizado (Baker-Austin *et al.*, 2010). Las infecciones por vibrios son comunes en países en desarrollo de África, Asia y América, donde algunas especies son endémicas y las condiciones de sanidad e higiene no son las adecuadas (Thapar & Sanderson, 2004; Nguyen *et al.*, 2009; Grim *et al.*, 2010; Jenkins *et al.*, 2010). Las infecciones por vibrios en humanos se transmiten principalmente por el consumo de mariscos mal cocinados o por el contacto de heridas con agua marina cálida (Altekruse *et al.*, 2000; Dechet *et al.*, 2008). Se puede observar que los reportes de vibriosis y presencia de estas bacterias tienen una marcada distribución estacional, habiendo más casos en los periodos del año más cálidos (Baross & Liston, 1970; DePaola *et al.*, 1973; Parveen *et al.*, 2008). Entre los factores de virulencia más conocidos está la toxina de la cólera que está codificada en el gen *ctx*, agente causante de diversos brotes epidémicos de la enfermedad (Waldor & Mekalanos, 1996). También destacan las hemolisinas codificadas por los genes *tdh*, *trh*, *tlh* y *hlyA*, las cuales han sido descritas en especies como *V. anguillarum*, *V. cholerae*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* (Gutierrez *et al.*, 2013; Yañez *et al.*, 2015; Baker-Austin *et al.*, 2010; Mahoney *et al.*, 2010; Paranjpye *et al.*, 2012; Hirono *et al.*, 1996). Otros factores de virulencia importantes son los genes relacionados con sistemas de secreción T3SS1 y T3SS2, donde destacan los

genes del sistema VAS, EPS, los genes *vir* y genes *Vop* (Trosky *et al.*, 2004; Kodama *et al.*, 2007; Robien *et al.*, 2003; Sloup *et al.*, 2017).

Por todo lo mencionado anteriormente, se hace interesante el estudio de las bacterias del género *Vibrio*, siendo de particular interés la diversidad, abundancia y los distintos elementos genómicos (factores de virulencia, elementos móviles, genes de resistencia a antibióticos, etc.) que pudieran poseer estas bacterias. Con este objetivo, se han empleado distintos métodos y enfoques, dentro de los que destaca el estudio del genoma de estas bacterias con técnicas de microbiología y biología molecular, y, en las últimas décadas, con el desarrollo de herramientas bioinformáticas.

1.5. Genética del género *Vibrio*

La identificación y clasificación de los vibrios es un asunto complejo debido a la gran similitud que hay entre algunas especies del género (Chibani *et al.*, 2020). Como se mencionó, los vibrios pueden generar infecciones en animales y humanos, generando daños tanto en la economía como a la salud de la población. Por este motivo, saber si hay presencia de genes que codifican para factores de virulencia es de gran utilidad para intentar predecir el potencial virulento de las cepas. Además de genes relacionados con factores de virulencia, los genomas pueden presentar regiones que codifican para proteínas involucradas en la resistencia a antimicrobianos, por lo que un análisis de este aspecto podría dar indicios de los compuestos tóxicos a los que son sensibles o resistentes estas bacterias (Engebrecht *et al.*, 1983; Hubbard *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2011). En comparación con *Escherichia coli* patogénica, el genoma de los vibrios presenta pocos elementos genéticos móviles, transposones, regiones con el contenido GC diferente al promedio del genoma y otros indicadores de transferencia horizontal de genes y plásmidos (Ohnishi *et al.*, 2001; Heidelberg *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2003). No obstante, se ha reportado que la transferencia horizontal de genes ha contribuido de manera importante en características de vibrios como, por ejemplo, la patogenicidad y sus nichos ecológicos (Boyd *et al.*, 2000; Karaolis *et al.*, 1994; Waldor & Mekalanos, 1996). Se ha reportado que los genes que codifican para la toxina de la cólera, principal factor de virulencia en *V. cholerae*, están codificados en el genoma del bacteriófago CTX ϕ , cuyo genoma está integrado al cromosoma como profago (Waldor & Mekalanos, 1996). Hoy sabemos que existen diversos

bacteriófagos filamentosos en *V. cholerae* y otras especies de vibrios (Campos *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1998; Finkelstein *et al.*, 2002; Kar *et al.*, 1996). Otra característica del género *Vibrio* es la presencia de super-integrones en su genoma (Clark *et al.*, 1997). Se han identificado super-integrones en varias especies de vibrios como *V. cholerae* (Rowe-Magnus *et al.*, 2001), *V. parahaemolyticus* (Tagomori & Honda, 2002) y *V. vulnificus* (Smith & Siebeling, 2003). Los super-integrones pueden actuar como fuente de genes en eventos evolutivos que pueden generar resistencia a antimicrobianos de relevancia clínica (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). También se han descrito islas de patogenicidad en vibrios como la isla de patogenicidad VPI (Karaolis *et al.*, 1998). Esta isla de patogenicidad contiene genes que codifican para hemolisinas, toxinas, enzimas, posibles proteínas de membranas y sistemas de secreción (Hueck, 1998).

Para el estudio genético de vibrios, se han desarrollado diversas técnicas y métodos de genotipificación como el análisis de restricción del ADN del gen ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés) (Vanechoutte *et al.*, 1992; Vanechoutte *et al.*, 1993; Vanechoutte *et al.*, 1995; Heyndrickx *et al.*, 1996). Esta técnica ha sido ampliamente utilizada por investigadores desde principios de 1990. Además de las técnicas de biología molecular, existen otros métodos basados en análisis bioinformáticos que han sido de gran utilidad en el estudio de comunidades bacterianas durante estas últimas décadas. Dentro de estos, están los análisis comparativos del gen *ARNr 16S*, (Dorsch *et al.*, 1992; Stackebrandt & Goebel, 1994; Ruimy *et al.*, 1994; Farmer *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2014) y el método del “porcentaje de identidad nucleotídica” entre dos genomas (ANI por sus siglas en inglés). Este último evalúa la composición nucleotídica de segmentos alineados presentes en los genomas a comparar (Goris *et al.*, 2007; Richter & Rosselló-Mora, 2009). Como se mencionó anteriormente, determinar la identidad de las especies de vibrios puede ser una tarea compleja, por lo que se han desarrollado nuevas técnicas para optimizar la capacidad de discriminación entre dos especies estrechamente relacionadas. Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad es el análisis de secuencias multilocus (MLSA por sus siglas en inglés), el cual consiste en extraer (para cada genoma a evaluar) las secuencias nucleotídicas de genes constitutivos, alinearlas y evaluar las relaciones taxonómicas entre organismos (Thompson *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2008; Nishiguchi & Nair, 2003; Tracz *et al.*, 2007; Le Roux *et al.*, 2004; Gevers *et al.*, 2004). Esta metodología surge

como respuesta a la baja resolución obtenida al utilizar únicamente el gen *ARNr 16S* para el análisis y ha sido exitosa para discernir e identificar dos especies de vibrios estrechamente relacionadas, como por ejemplo las especies pertenecientes al clado *harveyi* (Gabriel *et al.*, 2014). Existen diversos algoritmos y métodos que han sido empleados para alinear secuencias y obtener matrices de distancia entre conjuntos de datos para luego obtener un puntaje de alineamiento (Higgins & Sharp, 1988; Thompson *et al.*, 1994; Chenna *et al.*, 2003). El puntaje de alineamiento se calcula como la suma de los puntajes de la matriz de sustitución para cada par de bases alineadas, más la penalización por gaps (Edgar, 2004). Entre los métodos para alinear secuencias, está el de la mínima evolución, el de máxima parsimonia, UPGMA, el de máxima verosimilitud y el método de unión de vecinos (neighbor-joining) (Rzhetsky & Nei, 1993; Farris, 1983; Nakhleh *et al.*, 2005). El método de pares agrupados no ponderados con media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) agrupa los taxones de manera simple asumiendo una tasa de evolución constante, necesitando una matriz de distancia entre los taxones analizados que se pueda calcular a partir de un alineamiento múltiple (Sokal, 1958). En la actualidad, las técnicas desarrolladas para el estudio de genomas bacterianos cada vez son más masivas y variadas.

1.6. Vibrios en Chile

A la fecha se han aislado diferentes especies del género *Vibrio* en territorio chileno; *V. bivalvicida* y *V. tubiashii* en eventos de mortalidad masiva de ostiones (*Argopecten sp.*) (Rojas *et al.*, 2015; Rojas *et al.*, 2016), *V. parahaemolyticus* en muestras de choritos (*Mytilus chilensis*) (Bacian *et al.*, 2021) y en los brotes de los años 1997 (> 300 casos en Antofagasta), 2004 y 2005 (> 3.600 casos en Puerto Montt), además del brote de 2007 (> 475 casos en Puerto Montt) (Mancilla, 2005; González-Escalona *et al.*, 2005; Harth *et al.*, 2009; García *et al.* 2007; Yañez *et al.*, 2015), *V. splendidus* y *V. lentus* en la bahía de Tongoy (Oyanedel *et al.*, año no determinado), *V. ordalii* en centros de crecimiento de Salmón del Atlántico (Colquhoun *et al.*, 2004), *V. anguillarum* en salmón del atlántico, del pacífico y en trucha arcoíris (Silva-Rubio *et al.*, 2008), *V. cholerae* en brotes de gastroenteritis (Pérez-Reytor *et al.*, 2017; Arteaga *et al.*, 2020), *V. toranzoniae* en granjas de congrio (*Genypterus chilensis*) (Lasa *et al.*, 2015), *V. tapetis* en peces como congrio y lenguado (*Paralichthys adspersus*), entre otros reportes. Dada la importancia de la industria acuícola para la economía local de

varias regiones de Chile, los brotes de vibriosis podrían generar pérdidas económicas considerables aumentando el interés en el estudio por estas bacterias.

El objetivo principal de este trabajo de seminario de título es identificar y clasificar distintos aislados bacterianos del género *Vibrio* obtenidos desde muestras ambientales recolectadas en las costas de Quillaípe (Puerto Montt, Región de Los Lagos). Se espera que los resultados de este trabajo contribuyan a la caracterización de vibrios ambientales que puedan encontrarse en el sur de Chile, determinando si estos pueden ser reservorios de genes asociados a virulencia o de resistencia a compuestos tóxicos, tales como antibióticos o metales.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Identificar y genotipificar distintos aislados bacterianos del género *Vibrio* obtenidos desde muestras ambientales del sur de Chile.

2.2. Objetivos específicos

- ❖ Clasificar mediante una ribotipificación los aislados de vibrios obtenidos desde muestras ambientales del sur de Chile.
- ❖ Secuenciar e identificar los aislados de vibrios seleccionados.
- ❖ Analizar los genomas bacterianos de los vibrios seleccionados en búsqueda de elementos genómicos de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de aislados bacterianos

Los aislados bacterianos del estudio fueron provistos por el grupo de Bacteriófagos e Interacciones Microbianas (BIM) de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Estos aislados fueron obtenidos durante el primer semestre del 2020 desde muestras ambientales de agua y tejido blando de chorito (*Mytilus chilensis*) provenientes de la zona costera de Quillaipe, Puerto Montt (Región de Los Lagos, Chile). Durante el aislamiento se utilizó agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sal) para aislar vibrios y, posteriormente, estos aislados bacterianos fueron cultivados en medio AMS-LB. Se utilizaron crio-perlas (CryoInstant) como sistema de conservación de los aislados de los vibrios obtenidos y se almacenaron a -80°C. La lista de los aislados considerados en este estudio se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de aislados de vibrios provenientes de muestras ambientales considerados en el estudio.

Cepa bacteriana	Tipo de muestra	Fecha muestreo	Interpretación agar TCBS
P1B4	Tejido blando de chorito	Marzo 2020	No fermenta Sacarosa
P1B6	Tejido blando de chorito	Marzo 2020	No fermenta Sacarosa
M1AB1	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB3	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB8	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB9	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB14	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB15	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB23	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB24	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB27	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB27*	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M1AB29	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M3AB5	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M3AB8	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M3AB9	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa
M3AB11	Agua de mar	Marzo 2020	Fermenta Sacarosa

3.2. Extracción y purificación de ADN bacteriano

La extracción de ADN genómico de los aislados de vibrios se llevó a cabo utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard® de Promega© siguiendo el siguiente protocolo: Se tomó 1,0 mL de cultivo crecido durante la noche ($\sim 6 \times 10^9$ células/mL) en medio AMS-LB (agua de mar sintética más triptona y extracto de levadura), se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos para formar pellet celular y se eliminó el sobrenadante. Luego, se agregaron 600 μ L de solución de lisis nuclear y se resuspendieron las células. Posterior a eso, se incubaron las muestras a 80°C por 5 minutos con el objetivo de lisar las células y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 3 μ L de solución de ARNasas a las muestras de células lisadas, se mezcló y se incubó a 37°C por 45 minutos. Las muestras se dejaron enfriando a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 200 μ L de solución para precipitar proteínas de Promega© (buffer con alta concentración de sales) a las muestras de células lisadas y se mezcló vigorosamente con agitador vortex a alta velocidad, para luego incubar en hielo por 5 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm por 3 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente, se agitó invirtiendo el tubo y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm por 2 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante cuidadosamente, y se agregaron 600 μ L de etanol al 70% a temperatura ambiente y se agitó invirtiendo vigorosamente el tubo para lavar el pellet de ADN. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm por 2 minutos, se eliminó el etanol cuidadosamente y se secó la muestra al aire por 15 minutos. Finalmente, se agregaron 100 μ L de solución de rehidratación de ADN (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 7-8) y se incubó por una hora a 60 °C. La extracción del ADN fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE (2M Tris; 1 M ácido acético; 50 mM EDTA) a 90 V durante 40 minutos. El ADN fue visualizado con luz UV (Ultravioleta) y tinción por Safeview Plus de Fermelo Biotec©. Finalmente, se cuantificó y determinó la pureza del ADN extraído utilizando un espectrofotómetro MaestroNano MN-913 (Maestrogen, Inc.). El ADN obtenido se almacenó a -20°C.

3.3. Amplificación del gen del *ARNr 16S*

Para cada reacción en cadena de la polimerasa del gen *ARNr 16S* se elaboró una mezcla con: 3 μL de MgCl_2 25 mM, 5 μL del buffer de reacción 5X GoTaq® Flexi de Promega®, 0,5 μL de dNTPs 100 mM, 1,5 μL del partidor forward 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1,5 μL del partidor reverse 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 0,3 μL (1,5 U) de Taq Polimerasa de Promega®, 2 μL del ADN extraído de cada cepa seleccionada (>100 ng/ μL) y se completó con agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de reacción de 25 μL . El proceso de amplificación se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: denaturación inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de 25 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; y etapa de elongación final a 72°C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE a 90 V durante 40 minutos y visualizados con luz UV y tinción con Safeview Plus de Fermelo Biotec®.

3.4. Digestión de los productos de PCR

Los productos de la amplificación del gen del *ARNr 16S* fueron digeridos de manera independiente con las enzimas de restricción *HhaI*, *HinfI* y *MspI*. Para cada reacción, la mezcla de reacción contenía 8 μL de producto amplificado *ARNr 16S* (>200 ng/mL), 10 U de enzima de restricción y 1 μL de buffer de la enzima de restricción correspondiente. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante una hora y después se desactivó la enzima a 80°C por 20 minutos. Posteriormente, 3 μL del producto digerido fueron separados en gel de agarosa al 3% en buffer TAE a 90 V durante 90 minutos y visualizados mediante luz UV y tinción Safeview. Las imágenes de los geles fueron analizadas con el software CLIQS 1D Pro (TotalLab), obteniendo un dendrograma sin raíz en función de los patrones de restricción generados mediante la técnica UPGMA. De esta manera, se obtuvieron grupos de aislados con el mismo patrón de digestión entre los que se eligió un aislado representativo por cada grupo (en el caso del grupo IV se eligieron dos aislados debido a que provenían de tipos de muestras distintos) para secuenciar su genoma. Los genomas de los aislados representativos fueron purificados y secuenciados a través de la plataforma Illumina HiSeq de la empresa BGI (<https://www.bgi.com/global/>).

3.5. Ensamble de los genomas

Para realizar el ensamble de los genomas, se siguieron dos estrategias. Por un lado, se hizo un ensamble *de novo* a partir de las lecturas obtenidas de la secuenciación de los genomas de los aislados escogidos y, por otro lado, se realizó un ensamble a la referencia utilizando genomas de especies cercanas a los aislados seleccionados. Las lecturas obtenidas de la secuenciación se procesaron utilizando la herramienta BBDuk de Geneious. Se eliminaron las secuencias de adaptadores AllTruSeq, Nextera y PhiX en el extremo derecho y las secuencias de baja calidad (menores a Q20) a ambos extremos. También se eliminaron los adaptadores que fueron determinados por los extremos sobresalientes de las lecturas pareadas (con un mínimo de 20 pb). Todos los ensamblajes se llevaron a cabo con el software Geneious Prime (versión 9.1.8).

El ensamble *de novo* se realizó utilizando el algoritmo Geneious y el 50% de las lecturas procesadas. Los parámetros utilizados fueron: sensibilidad media-baja, identidad mínima del 80% en la superposición de las lecturas, un máximo de 20% de mismatches por lectura y cortando las regiones sin cobertura. Para el ensamble a la referencia, primero se identificó un posible genoma de referencia utilizando los cinco contigs de mayor tamaño obtenidos en el ensamble *de novo*. Las secuencias de estos contigs fueron utilizadas junto a la herramienta blastn de NCBI, utilizando el programa megablast y los demás parámetros por defecto, para identificar genomas de especies de vibrios presentes en GeneBank, y que fuesen cercanos a los aislados de este estudio, para así utilizarlos como genoma de referencia. Los genomas de referencia fueron seleccionados en base a los criterios de cobertura y porcentaje de identidad de acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis blastn. Las secuencias determinadas mediante BLAST de NCBI con las que se realizó el ensamble a la referencia del genoma de los diferentes aislados se muestran en la Tabla 2. El ensamble a la referencia se llevó a cabo iterando cinco veces y utilizando los mismos parámetros que el ensamble *de novo*.

Tabla 2. Genomas de vibrios utilizados para realizar el ensamble a la referencia. Se utilizó las secuencias del cromosoma uno y dos de las especies de *Vibrio* señaladas.

Aislado bacteriano	Genoma de referencia	N° Acceso
M3AB11	<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109	NZ_CP009354 / NZ_CP009355
M3AB5	<i>Vibrio tubiashii</i> ATCC 19109	NZ_CP009354 / NZ_CP009355
M1AB29	<i>Vibrio alginolyticus</i> HNV2	NZ_CP082307 / NZ_CP082308
P1B4	<i>Vibrio jasicida</i> 090810c	NZ_CP025792 / NZ_CP025793
M1AB15	<i>Vibrio antiquarius</i> strain EX25	NZ_CP001805 / NZ_CP001806
M3AB8	<i>Vibrio cyclitrophicus</i> ECSMB14105	NZ_CP039700 / NZ_CP039701

Una vez generados los ensamblajes *de novo* y a la referencia para cada aislado, se procedió a comparar los ensamblajes con el fin de determinar cuál es de mejor calidad para los análisis posteriores. Para comparar la calidad de los ensamblajes *de novo* y a la referencia, y seleccionar el de mejor calidad para análisis posteriores, se utilizó la herramienta QUAST (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies; <http://quast.sourceforge.net>) (Gurevich *et al.*, 2013) y CheckM (Parks *et al.*, 2015).

En este caso, se compararon todos los contigs generados de las secuencias consenso del ensamblaje *de novo* y ensamblaje a la referencia de ambos genomas. Los parámetros utilizados para evaluar los ensamblajes fueron: el número de contigs generados; el contig más largo y el largo total, donde entre mayor tamaño, mejor es el ensamblaje; los parámetros N50, N75, L50, L75 y el número de mismatches por cada 100 kb. El N50 se define como la longitud de secuencia del contig más corto al 50% de la longitud total del genoma. En tanto, el parámetro L50 corresponde al número más pequeño de contigs cuya longitud suma la mitad del tamaño del genoma (Miller *et al.*, 2010). El N75 y L75 son parámetros similares, pero para el 75% del genoma.

3.6. Análisis de secuencias multilocus e identificación de especies

Con el objetivo de determinar la especie de *Vibrio* más cercana a los aislados bacterianos secuenciados, se llevó a cabo un análisis de secuencias multilocus (MLSA por sus siglas en inglés). Con este objetivo, se utilizó la herramienta RASTk para determinar las secuencias de los genes constitutivos *ftsZ*, *gnd*, *gyrB*, *metG*, *pyrH*, *recA*, *rpoA* y *pyrC* provenientes del genoma ensamblado de los aislados bacterianos. Además, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de dichos genes provenientes de 69 genomas referenciales de *Vibrio* desde la

base de datos de NCBI antes de marzo 2022. Las secuencias de los genes fueron validadas mediante un alineamiento de las secuencias por cada gen usando el algoritmo ClustalW en el software Geneious Prime. El alineamiento fue chequeado manualmente y se cortaron los extremos para normalizar el largo de las secuencias. Luego, las secuencias de los genes de cada especie fueron combinadas para formar las secuencias concatenadas para el MLSA. Las secuencias concatenadas fueron alineadas utilizando nuevamente el algoritmo ClustalW en el software MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y se elaboró un dendrograma utilizando el modelo neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987; Didelot *et al.*, 2010) con el método de máxima verosimilitud compuesta. El dendrograma fue elaborado mediante pruebas de bootstrap con 1.000 replicaciones, lo cual proporciona una validación estadística de la topología del árbol consenso a través de un remuestreo aleatorio. Además, se contó el número de nodos con valores de arranque superiores a 80 y se dividió por el número total de nodos presentes en el árbol para obtener un puntaje de fiabilidad para ese árbol.

Esta metodología se basó en un estudio previo sobre la optimización del análisis MLSA para la identificación de especies del género *Vibrio* (Gabriel *et al.*, 2014). Finalmente, se clasificaron las especies en distintos clados tomando como referencia el trabajo de Gabriel *et al.* (2014). Los datos del largo parcial de las secuencias de los genes usados para el MLSA se muestran en la Tabla 8. Como análisis secundario, se utilizó la herramienta SpeciesFinder de CGE (<https://cge.food.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>) (Larsen *et al.*, 2014) para determinar la especie a la que pertenecen los aislados analizados. Esta herramienta utiliza otros genes para comparar y determinar la similitud entre las especies. Además, se utilizó la técnica ANI a través del algoritmo orthoANI (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) (Yoon *et al.*, 2017) para corroborar la especie de cada aislado.

3.7. Identificación y anotación factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos y profagos

La identificación y anotación general de los genomas de los aislados representativos se llevó a cabo usando la herramienta RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology; <https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) (Overbeek *et al.*, 2013). La anotación funcional realizada con esta herramienta se hizo utilizando el esquema RASTk, corrigiendo los marcos de lecturas y

rellenando los gaps, en el resto de los parámetros se utilizó la configuración por defecto. Luego, se realizó la búsqueda de elementos de interés dentro de los genomas como genes relacionados con factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, profagos y elementos móviles. Para la identificación de factores de virulencia se utilizó blastn y la base de datos de VFDB con los parámetros por defecto y filtrando las regiones de baja complejidad (Virulence Factor Database; <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)(Lui *et al.*, 2018). Para la identificación de genes de resistencia a antibióticos se usó la herramienta CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database; <https://card.mcmaster.ca/>) (Alcock *et al.*, 2020). Para la anotación de elementos genómicos relacionados a profagos, se utilizó la herramienta PHASTER (Phage Search Tool Enhanced Release; <https://phaster.ca/>) (Arndt *et al.*, 2016) con parámetros por defecto. Por último, los elementos genómicos móviles fueron identificados en base a la anotación realizada por RASTk.

4. RESULTADOS

4.1. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN genómico de los aislados bacterianos estudiados fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa, donde se observó una banda de ADN de alto peso molecular (sobre 10 kb), sin degradación ni contaminación por ARN (Figura 1). Además, se observa que hay una concentración suficiente para los análisis posteriores estimada a partir de la intensidad de la banda y la cantidad de muestra cargada. A través de espectrofotometría se confirmó que la concentración mínima aproximada fue de 100 ng/ μ L en cada de extracción de ADN (Tabla 3).

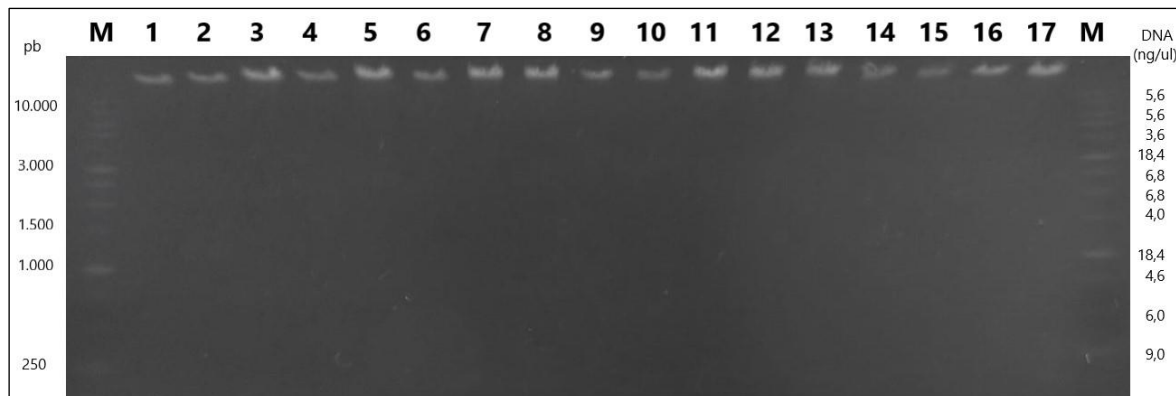


Figura 1. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de las extracciones de ADN genómico. M) Marcador de peso molecular 1kb de Promega ©, 1) P1B4, 2) P1B6, 3) M1AB1, 4) M1AB3, 5) M1AB8, 6) M1AB9, 7) M1AB14, 8) M1AB15, 9) M1AB23, 10) M1AB24, 11) M1AB27, 12) M1AB27*, 13) M2AB29, 14) M3AB5, 15) M3AB8, 16) M3AB9 y 17) M3AB11.

Tabla 3. Concentración y pureza del ADN genómico extraído de los aislados ambientales secuenciados.

Aislado	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M1AB9	M3AB8
Concentración (μ g/ μ L)	723,9	564,5	n/d	n/d	n/d	1111,0	258,6
280nm/260nm	2,03	2,00	n/d	n/d	n/d	1,96	1,98
260nm/230nm	2,31	2,10	n/d	n/d	n/d	2,03	2,53

*n/d: no determinado

4.2. Amplificación del gen del *ARNr 16S*

El ADN genómico extraído de los 17 aislados bacterianos fue sometido a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo de amplificar el gen del *ARNr 16S*. La amplificación fue confirmada mediante una electroforesis en gel de agarosa donde se observó una banda intensa de aproximadamente 1.500 pb para todos los aislados bacterianos (Figura 2). En la figura, también se observan bandas de tamaño superior que pueden corresponder a amplificaciones inespecíficas.

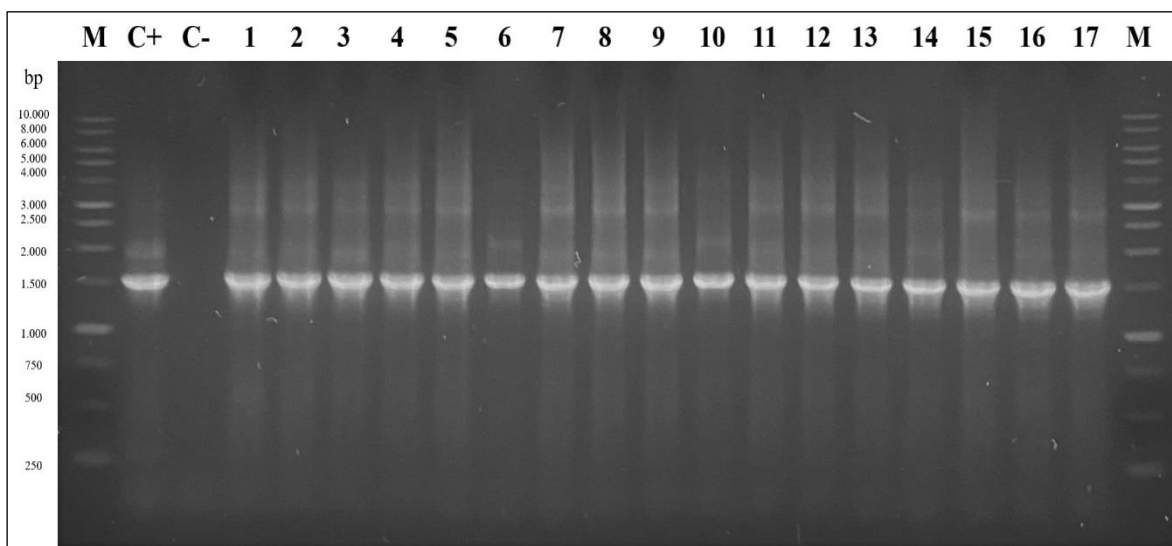


Figura 2. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de los productos PCR. M) Marcador de peso molecular 1kb de Promega®, C+) control positivo, C-) control negativo 1) P1B4, 2) P1B6, 3) M1AB1, 4) M1AB3, 5) M1AB8, 6) M1AB9, 7) M1AB14, 8) M1AB15, 9) M1AB23, 10) M1AB24, 11) M1AB27, 12) M1AB27*, 13) M2AB29, 14) M3AB5, 15) M3AB8, 16) M3AB9 y 17) M3AB11.

4.3. Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

El producto amplificado del gen del *ARNr 16S* de cada aislado bacteriano fue digerido, de manera independiente, con las endonucleasas *HhaI*, *HinfI* y *MspI* para obtener distintos patrones de restricción y, así, poder determinar los ribotipos de los distintos aislados (Figura 3).

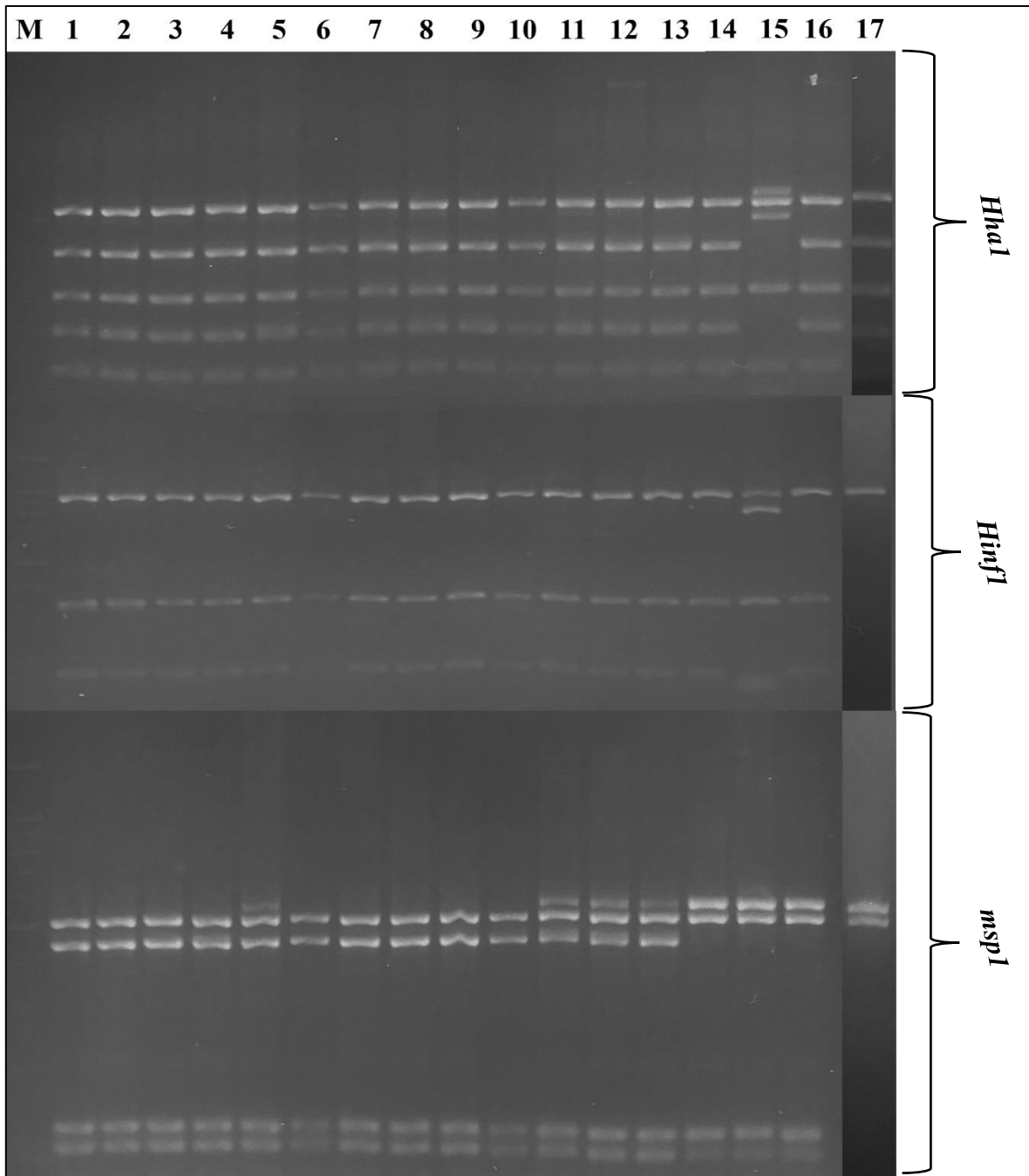


Figura 3. Visualización de electroforesis en gel de agarosa de la digestión del producto amplificado del gen del *ARNr 16S*. M) Marcador de peso molecular 100 pb de Promega©, 1) P1B4, 2) P1B6, 3) M1AB1, 4) M1AB3, 5) M1AB8, 6) M1AB9, 7) M1AB14, 8) M1AB15, 9) M1AB23, 10) M1AB24, 11) M1AB27, 12) M1AB27*, 13) M2AB29, 14) M3AB5, 15) M3AB8, 16) M3AB9 y 17) M3AB11. La imagen se compuso a partir de distintos geles de electroforesis.

Con los patrones de restricción obtenidos se elaboraron dendrogramas que representan gráficamente las relaciones entre los distintos aislados del estudio.

Los resultados del análisis muestran que la enzima *HhaI* fue la que tuvo menor capacidad de discriminación generando tres patrones de restricción distintos. En cambio, tanto la enzima *HinfI* como *MspI* generaron cuatro patrones de restricción cada una. Aunque ambas enzimas, *HinfI* y *MspI*, producen cuatro patrones de restricción cada una, la distribución de los aislados en los grupos generados por la enzima *HinfI* se asemeja más a la distribución generada por la enzima *HhaI* que a la obtenida con la enzima *MspI* (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos determinados por la técnica ARDRA según el ribotipo obtenido para cada endonucleasa utilizada.

Endonucleasa	Grupo	Aislados bacterianos
<i>HhaI</i>	I	M3AB11
	II	P1B4, P1B6, M1AB1, M1AB3, M1AB8, M1AB9, M1AB14, M1AB15, M1AB23, M1AB24, M1AB27, M1AB27*, M1AB29, M3AB5 y M3AB9
	III	M3AB8
<i>HinfI</i>	I	M3AB11
	II	P1B4, P1B6, M1AB1, M1AB3, M1AB8, M1AB14, M1AB15, M1AB23, M1AB24, M1AB27, M1AB27*, M1AB29, M3AB5 y M3AB9
	III	M1AB9
	IV	M3AB8
<i>MspI</i>	I	M3AB11
	II	M3AB5, M3AB8 y M3AB9
	III	M1AB8, M1AB27, M1AB27* y M1AB29
	IV	P1B4, P1B6, M1AB1, M1AB3, M1AB9, M1AB14, M1AB15, M1AB23 y M1AB24

Para lograr una mayor resolución en la discriminación de los aislados bacterianos se elaboró un dendrograma integrando el análisis de las tres enzimas de restricción mencionadas anteriormente de manera individual (*HhaI*, *HinfI* y *MspI*). De este modo se logró determinar seis grupos distintos entre los 17 aislados bacterianos (Figura 4 y Tabla 5). Se observa que el grupo IV es el mayoritario con 8 aislados. También se observa que los grupos I, V y VI están compuestos por un único aislado (M3AB11, M1AB9 y M3AB8, respectivamente).

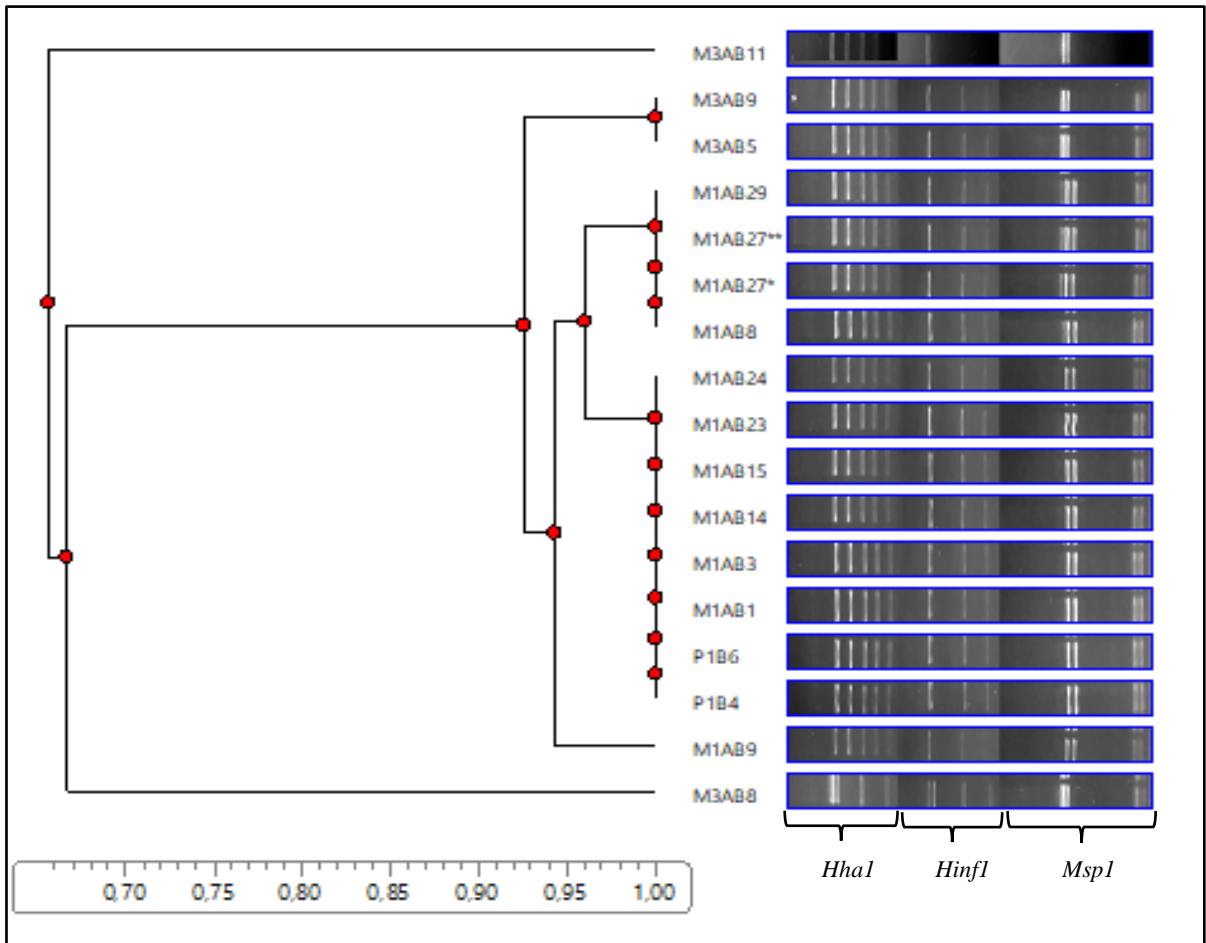


Figura 4. Dendrograma obtenido integrando la digestión realizada por las tres endonucleasas. Se utilizó el método UPGMA.

Tabla V. Grupos determinados por la técnica ARDRA según el ribotipo de la digestión del gen del *ARNr 16S* por las enzimas de restricción *HhaI*, *HinfI* y *MspI*. Los aislados seleccionados para secuenciar su genoma están destacados.

Grupo	Aislados bacterianos
I	<u>M3AB11</u>
II	<u>M3AB5</u> , M3AB9
III	M1AB8, M1AB27, M1AB27*, <u>M1AB29</u>
IV	<u>P1B4</u> , P1B6, M1AB1, M1AB3, M1AB14, <u>M1AB15</u> , M1AB23, M1AB24
V	<u>M1AB9</u>
VI	<u>M3AB8</u>

Los aislados representantes de cada grupo fueron determinados al azar, salvo en el caso del grupo IV, donde se consideraron dos aislados representantes que provienen de distinto origen. De esta forma, los aislados representativos seleccionados son M3AB11, M3AB5, M1AB29, P1B4, M1AB15, M1AB9 y M3AB8.

4.4. Secuenciación y análisis genómico

Los datos obtenidos de la secuenciación se muestran en la Tabla 6. Se observa que el número total de secuencias varía aproximadamente entre los 12 y 28 millones siendo todas de 100 pb de largo. También, se observa que la cantidad de lecturas con calidad superior a Q20 alcanza el 96,9% promedio y su composición de GC varía entre 42,3% y 45,0%.

Tabla 6. Resultados de la secuenciación de los genomas entregados por la empresa BGI.

Aislado	Plataforma de secuenciación	N° total de secuencias	Largo de las secuencias (pb)	% Q20	% GC
M3AB11	Illumina HiSeq	12.200.520	100	97,3	42,3
M3AB5	Illumina HiSeq	12.136.136	100	97,2	43,7
M1AB29	Illumina HiSeq	27.077.884	100	96,4	44,2
P1B4	Illumina HiSeq	28.404.298	100	96,3	44,8
M1AB15	Illumina HiSeq	26.230.484	100	96,5	45,0
M3AB8	Illumina HiSeq	12.119.314	100	97,6	43,7

Las lecturas obtenidas en la secuenciación fueron procesadas para eliminar los datos de baja calidad (menores a Q20) y las secuencias de adaptadores. Como se observa en la Figura 5, la mayoría de las lecturas después del procesamiento presentan un Qscore que varía entre 34 y 36, lo que indica una precisión de lectura superior al 99,9%. Estos datos fueron obtenidos utilizando la herramienta FastQC.

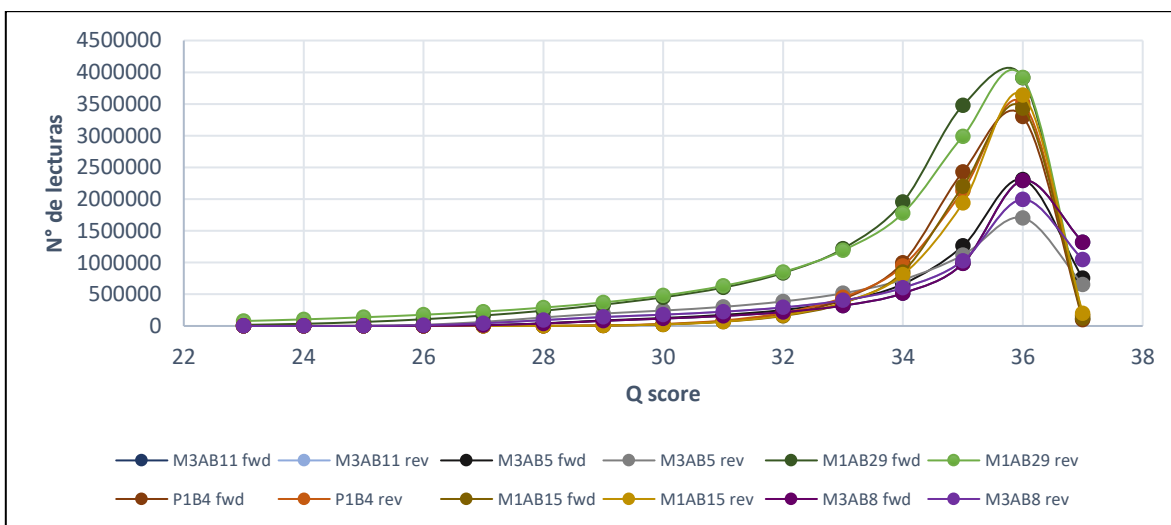


Figura 5. Distribución de la cantidad de lecturas post-procesamiento en función del Qscore. Se observan las lecturas forward y reverse del genoma de los seis aislados secuenciados.

4.5. Ensamble de los genomas bacterianos

Al comparar la calidad de los ensamblados *de novo* con la referencia para cada aislado utilizando el software QUAST, se determinó usar el ensamblado *de novo* en cada caso para los análisis posteriores. La cantidad de lecturas ensambladas están entre los 6 y 7 millones aproximadamente, lo que está sobre el 99% del set de datos utilizados para los ensamblados. También, se puede observar que para cada aislado se generaron al menos 10 *contigs* de largo mayor a las 100.000 pb, lo que indica que existen regiones extensas del genoma que fueron ensambladas de forma continua. El largo total de los ensamblados va aproximadamente desde los 5 millones hasta los 6,2 millones de pb y se observa una composición de GC entre 43% y 45%. El aislado bacteriano P1B4 es el que presenta el genoma de mayor tamaño con 6,26 Gb, mientras que el genoma de M3AB8 es el de menor tamaño con aproximadamente 4,99 Gb. Los ensamblados de los genomas tienen una cobertura superior a 120 lecturas por posición y presentan un valor en los parámetros de calidad (N50, N75, L50 y L75) adecuados para ensamblados de genomas bacterianos. Es más, en el aislado P1B4, que es el de menor calidad según estos parámetros, se observa que el 75% del largo del genoma está cubierto solamente por 14 *contigs* y todos superiores a los 120 kb. El análisis de CheckM utilizando los marcadores genómicos de *Vibrio* indica rangos de integridad y contaminación de los genomas que van desde 99,7% hasta 100% y desde 0,45% hasta 4,68%, respectivamente. El aislado M1AB15 presenta el *contig* más largo con cerca de 1,2 Gb. Los resultados mencionados anteriormente junto con los valores de N50, N75, L50, L75, integridad y contaminación, indican que el ensamblado del genoma de M1AB15 es el de mejor calidad en comparación con los otros genomas considerados en el estudio. Las estadísticas de los ensamblados de los distintos genomas se presentan en la Tabla 7. Los resultados obtenidos sugieren que los ensamblados son de una buena calidad para continuar con los análisis taxonómicos y genómicos posteriores.

Tabla 7. Estadísticas del ensamble de los genomas de los aislados de vibrios secuenciados.

Aislado bacteriano	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
Lecturas ensambladas	6.077.498	6.046.286	7.211.804	7.535.928	7.222.966	6.010.739
Lecturas no usadas	15.432	13.574	1.918	2.989	1.385	32.346
Total contigs	315	276	291	467	227	321
Contigs > 1.000 pb	49	47	27	59	26	24
Contigs > 10.000 pb	35	32	22	39	21	16
Contigs > 100.000 pb	13	13	11	15	19	10
Contig más largo (pb)	546.602	588.008	892.212	800.919	1.194.498	940.480
Tamaño contig promedio (pb)	16.043	18.278	18.278	13.397	22.873	15.535
Cobertura promedio (lecturas/por posición)	121,38	120,72	137,1	121,8	140,0	121,8
Largo total (pb)	5.053.797	5.044.786	5.301.651	6.256.691	5.192.171	4.986.796
GC (%)	43,84	43,84	44,53	45,02	44,88	43,57
N50	336.188	336.203	579.278	397.028	856.268	774.050
N75	141.798	159.883	346.845	124.135	228.951	286.092
L50	6	6	4	6	3	3
L75	12	11	7	14	6	6
N° mismatches/100 kb	51,91	34,62	23,71	57	11,63	25,9
Genes predichos	3.398	3.392	3.693	4.384	3.699	3.254
Integridad (%)	99,91	99,91	100	99,74	100	99,87
Contaminación (%)	4,68	4,68	0,75	0,64	0,45	0,94

4.6. Análisis multilocus de secuencias (MLSA) e identificación a nivel de especie

La identificación de los distintos aislados se realizó por MLSA. Los genes constitutivos considerados en el análisis fueron identificados a partir de la anotación realizada por el programa RASTk. A continuación, en la Tabla 8 se muestran los genes seleccionados para el análisis. El análisis se realizó normalizando el largo de cada gen con el largo del concatenado de todos los genes, obteniendo un largo total de 8.072 pb. Estas secuencias se compararon con las secuencias de estos genes de otras 69 especies de *Vibrio* obtenidas desde GeneBank. La lista de números de acceso a la secuencia del genoma referencial de cada especie de *Vibrio* se muestra en la Tabla S8 de ANEXOS.

Tabla 8. Información de los genes constitutivos utilizados para realizar el MLSA.

Nombre gen	<i>ftsZ</i>	<i>Gnd</i>	<i>gyrB</i>	<i>metG</i>	<i>pyrH</i>	<i>recA</i>	<i>rpoA</i>	<i>pyrC</i>
Largo (pb)	950	1.231	2.156	1.849	283	282	274	1.047

Los resultados del MLSA sugieren que los aislados M3AB11 y M3AB5 corresponden a la especie *Vibrio pacinii* del clado *pacinii*, mientras que el aislado M3AB8 pertenece probablemente a la especie *Vibrio cyclitrophicus* del clado *splendidus*. Por su parte, los aislados M1AB29, P1B4 y M1AB15 pertenecerían a las especies *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio jasicida* y *Vibrio diabolicus*, respectivamente, las tres pertenecientes al clado *harveyi* (Figura 6). El dendrograma resultante corresponde a un árbol sin raíz obtenido mediante un método de agrupamiento iterativo basado en el criterio de mínima evolución. Se observan valores de *bootstrap* cercanos a 100 en los nodos próximos a donde se ubicaron los aislados bacterianos del estudio. Se observa, además que los aislados M1AB15 y M1AB29 son bastante cercanos a *V. parahaemolyticus*, especie que ha sido descrita como patógena para humanos. Por su parte, el aislado P1B4 está en otra rama del clado cuyo nodo común con la rama de los aislados M1AB15 y M1AB29 tiene un valor de *bootstrap* de 99 y está más cercano a la especie *V. harveyi*, lo que sugiere que la separación entre el aislado P1B4 y los otros aislados es confiable. Los resultados muestran que el dendrograma presenta gran robustez en todos sus nodos indicando que la formación de los nodos no fue azarosa. El puntaje de fiabilidad para el MLSA realizado con el método de neighbor-joining es de 0,78.

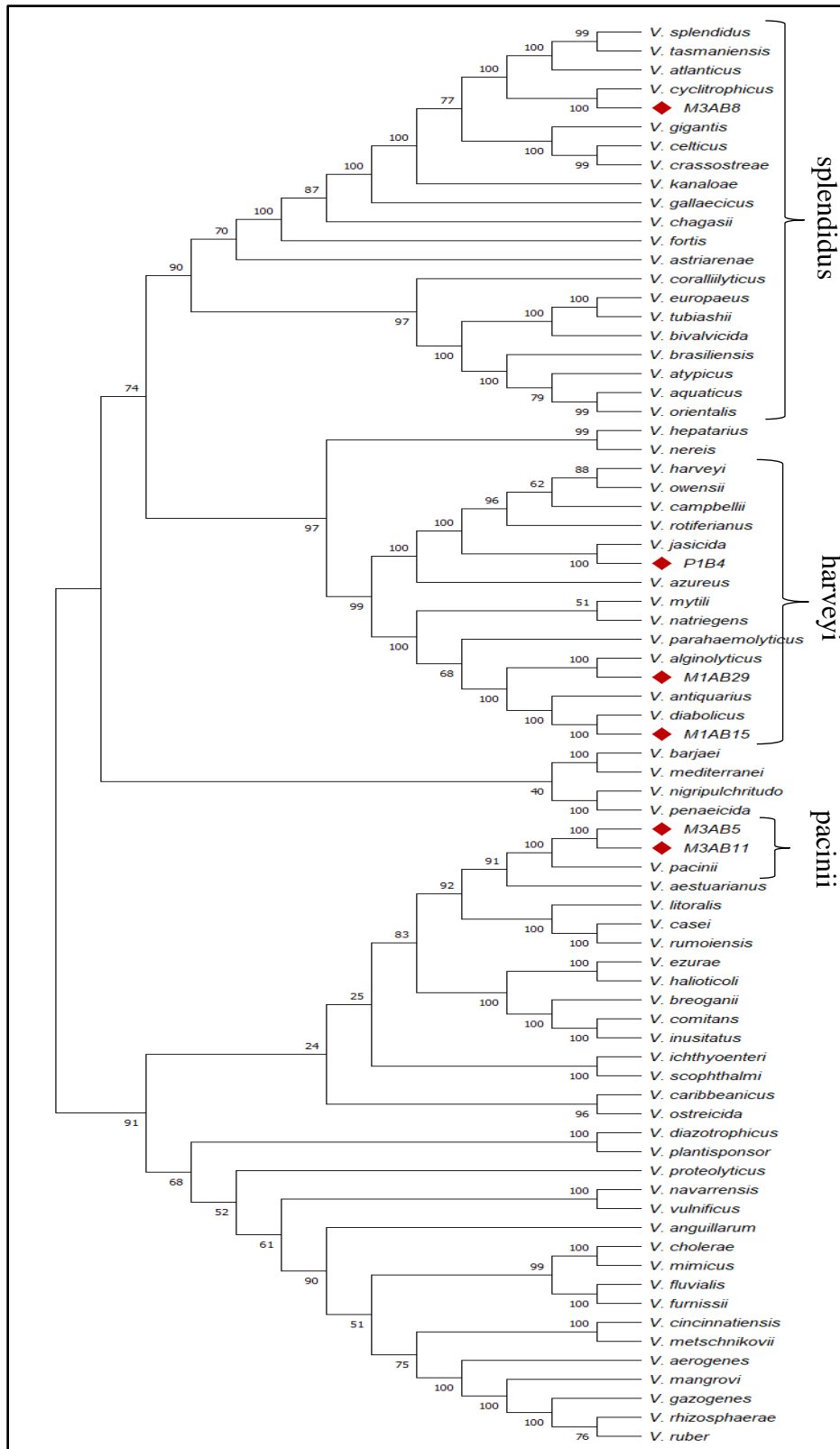


Figura 6. Dendrograma obtenido del MLSA utilizando el método neighbor-joining con pruebas bootstrap de 1000 repeticiones. La clasificación en los clados se realizó en base al trabajo de Gabriel *et al.* (2014).

Los resultados del análisis mediante la herramienta SpeciesFinder, se muestran en la Tabla 9. Esta herramienta ocupa un conjunto de genes distintos a los utilizados en el MLSA para comparar la similitud entre especies. Según estos resultados el aislado P1B4 correspondería a la especie *V. jasicida* y el aislado M3AB8 a la especie *V. cyclitrophicus*, mientras que los aislados M3AB29 y M1AB15 corresponderían a la especie *V. alginolyticus*. Coincidentemente, en este caso los aislados M3AB11 y M3AB5 también fueron identificados como *V. pacinii*.

Tabla 9. Resultados de la identificación de especies obtenidos con la herramienta SpeciesFinder de CGE.

	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
Identidad	<i>V. pacinii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. jasicida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>
Acceso	AJ316194	AJ316194	CP013484	MSCF01000004	CP014045	AHTI02000028
Confidencia	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado

Además del MLSA y del análisis con la herramienta SpeciesFinder, se corroboró la identidad de las especies de los aislados mediante la identidad promedio de nucleótidos (ANI, por las siglas en inglés). Para esto, se utilizaron los mismos 69 genomas referenciales que se usaron para extraer los genes constitutivos en el MLSA. Los resultados muestran que, en cada aislado, el valor orthoANI comparado con la especie determinada por el MLSA es superior al 95%, valor que se ha descrito como umbral para determinar una especie del género *Vibrio* mediante este método. Los resultados obtenidos por este método ratificarían que los aislados M3AB11 y M3AB5 corresponderían a *V. pacinii*, el aislado M1AB29 correspondería a *V. alginolyticus*, el aislado P1B4 a la especie *V. jasicida* y el aislado M3AB8 correspondería a *V. cyclitrophicus*. Los resultados del análisis ANI se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la identificación de especies obtenidos mediante la identidad promedio de nucleótidos (ANI).

Aislado	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
Valor orthoANI	98,85%	98,84%	98,60%	97,91%	97,96%	99,14%
Largo total alineamiento (pb)	2.602.598	2.605.585	3.422.661	3.818.004	3.405.488	3.373.988
Identidad	<i>Vibrio pacinii</i>	<i>Vibrio pacinii</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio jasicida</i>	<i>Vibrio diabolicus</i>	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>
Acceso	NZ_JONH01000001	NZ_JONH01000001	NZ_LOSN02000001	NZ_CP025792	NZ_CP014094	NZ_CP039700

Los resultados anteriores corroboran la correcta clasificación de los aislados en sus respectivos clados. Considerando la sumatoria de los análisis realizados, sugerimos que las identidades de los distintos aislados corresponden a *V. pacinii* (M3AB11 y M3AB5), *V. alginolyticus* (M1AB29), *V. jasicida* (P1B4), *V. diabolicus* (M1AB15) y *V. cyclitrophicus* (M3AB8) (Tabla 11). Únicamente el resultado de la identificación de M1AB15 mediante SpeciesFinder discrepa de los resultados obtenidos mediante el MLSA y el método ANI.

Tabla 11. Comparación entre métodos utilizados para la identificación de las especies de *Vibrio* correspondientes a los distintos aislados.

Método identificación	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
Identidad de acuerdo a MLSA	<i>V. pacinii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. jasicida</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>
Identidad de acuerdo a SpeciesFinder	<i>V. pacinii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. jasicida</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>
Identidad de acuerdo a ANI	<i>V. pacinii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. jasicida</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>
Identidad determinada	<i>V. pacinii</i>	<i>V. pacinii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. jasicida</i>	<i>V. diabolicus</i>	<i>V. cyclitrophicus</i>

4.7. Anotación de elementos genéticos de interés presentes en los genomas bacterianos

Para detectar los componentes genéticos de interés presentes en los distintos aislados de *Vibrio* secuenciados, se analizaron los resultados obtenidos con la herramienta RASTk. Los distintos aislados tienen entre 4.376 y 5.737 genes, y entre 112 y 172 secuencias de ARN no codificantes. Se destacan los aislados M3AB5 y M3AB11 que, pese a tener un ribotipo diferente, presentan un perfil genómico sumamente parecido, siendo los únicos que presentan elementos del sistema CRISPR (44 elementos cada uno, entre arreglos, repeticiones y espaciadores), además de presentar la mayor cantidad de repetidos y ARN no codificantes. Los aislados miembros del clado harveyi presentan un perfil más variado, siendo P1B4 el que tiene mayor cantidad de genes con casi 1.000 elementos más que los otros aislados. El aislado M3AB8 es el que presenta la menor cantidad de secuencias codificantes y secuencias no codificantes totales, no obstante, presenta mayor cantidad de elementos clasificados en subsistemas que los dos aislados de *V. pacinii*. Las estadísticas de la anotación general de los genomas mediante la herramienta RAST se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Estadísticas de las características genómicas de los aislados secuenciados obtenidos de la anotación por RASTk.

Aislado	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
CDS	5.121	5.123	4.918	5.737	4.846	4.376
Repetidos no codificantes	293	278	172	263	187	126
ARN no codificantes	144	146	172	112	112	127
CRISPR-array no codificantes	1	1	0	0	0	0
CRISPR-repeat no codificantes	22	22	0	0	0	0
CRISPR-spacer no codificantes	21	21	0	0	0	0
Total	5.602	5.591	5.202	6.112	5.145	4.629

En la Figura 7 se observa que los seis genomas de *Vibrio* secuenciados presentan mayor cantidad de elementos genómicos asociados a funciones del metabolismo de carbohidratos con un promedio de 345 características genómicas.

Le siguen los elementos asociados al metabolismo de aminoácidos y sus derivados con un promedio de 337 genes y por los elementos asociados al metabolismo de vitaminas y cofactores con 164 genes en promedio. Por otro lado, el análisis revela que los aislados M3AB11 y M3AB5 son los que presentan la menor cantidad de elementos asociados a virulencia con 36 y 37 genes, respectivamente. Al contrario, los aislados P1B4 y M3AB8 son los que presentan más elementos asociados a virulencia con 62 y 57 genes, respectivamente. En promedio los genomas de los aislados presentan 83 elementos asociados con la respuesta al estrés, siendo el aislado M1AB29 el que más características tiene con 91 genes. Esto sugiere que los aislados tendrían características genómicas que le permitirían adaptarse a los estímulos del entorno de donde provienen.

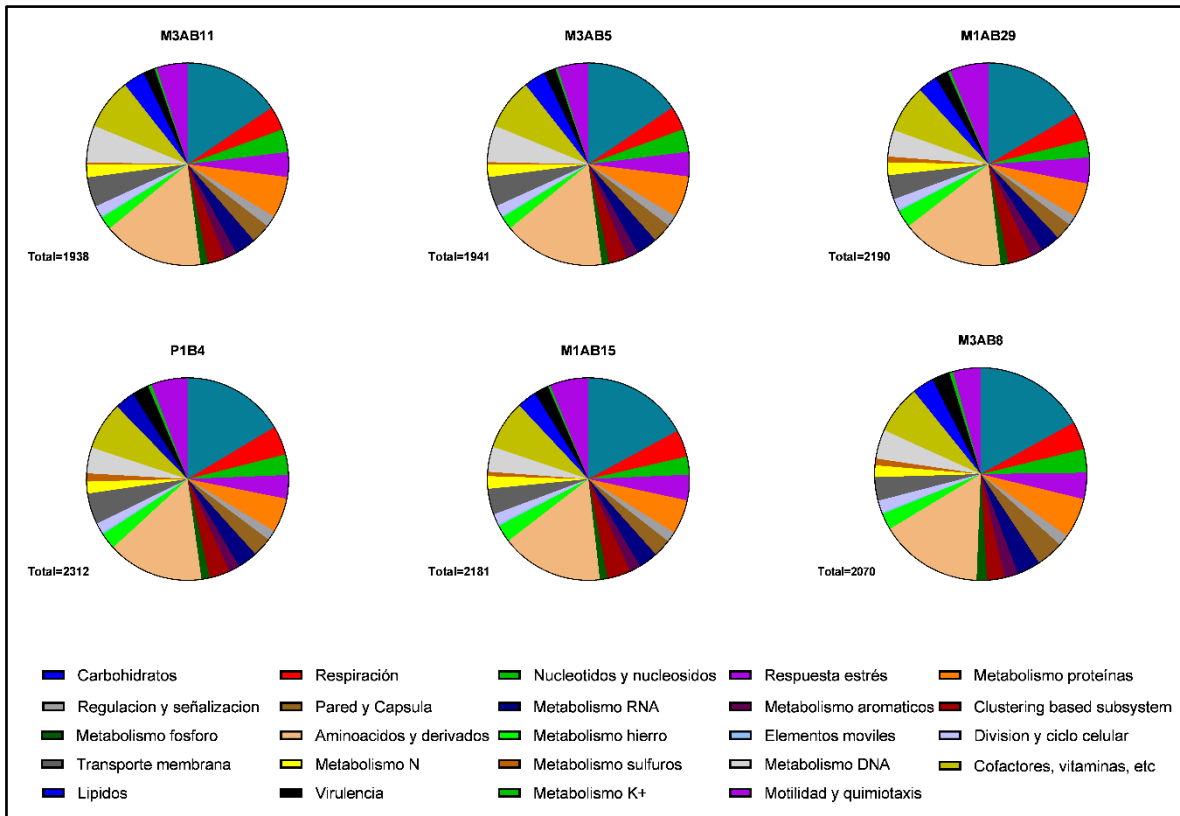


Figura 7. Cantidad de elementos genómicos identificados en cada aislado agrupados según su funcionalidad. Esquema obtenido de la anotación mediante RASTk.

En particular la anotación de los factores de virulencia indica, al igual que la anotación general de los elementos genómicos, una distribución de genes más parecida entre aislados más cercanos filogenéticamente, en relación con otros aislados más distantes. Se observa que los aislados M1AB29, P1B4, M1AB15 y M3AB8 presentan entre 5 y 14 más factores de virulencia asociados a antifagocitosis y a homeostasis de hierro, respectivamente, que los aislados M3AB11 y M3AB5 pertenecientes al clado pacinii. En particular, el aislado P1B4 presenta más características asociadas a la homeostasis de hierro. Por otro lado, el aislado M3AB8 es el que presenta menos cantidad de genes de sistemas de secreción (Figura 8). Si bien los seis aislados presentan un número similar de factores de virulencia asociados a quimiotaxis y motilidad, en general los aislados miembros del clado harveyi son los que presentan más características asociadas a virulencia. En relación con los sistemas de secreción, los resultados indican que los seis aislados estudiados presentan genes relacionados con el sistema de secreción extracelular de proteínas (EPS) T2SS.

Los miembros del clado harveyi son los únicos que presentan genes relacionados con el T3SS1 (como el gen *virF* que codifica para un activador transcripcional asociado con virulencia). Por su parte, los aislados M3AB11 y M3AB5 (y en menor cantidad P1B4) presentan genes asociados con el sistema VAS T4SS.

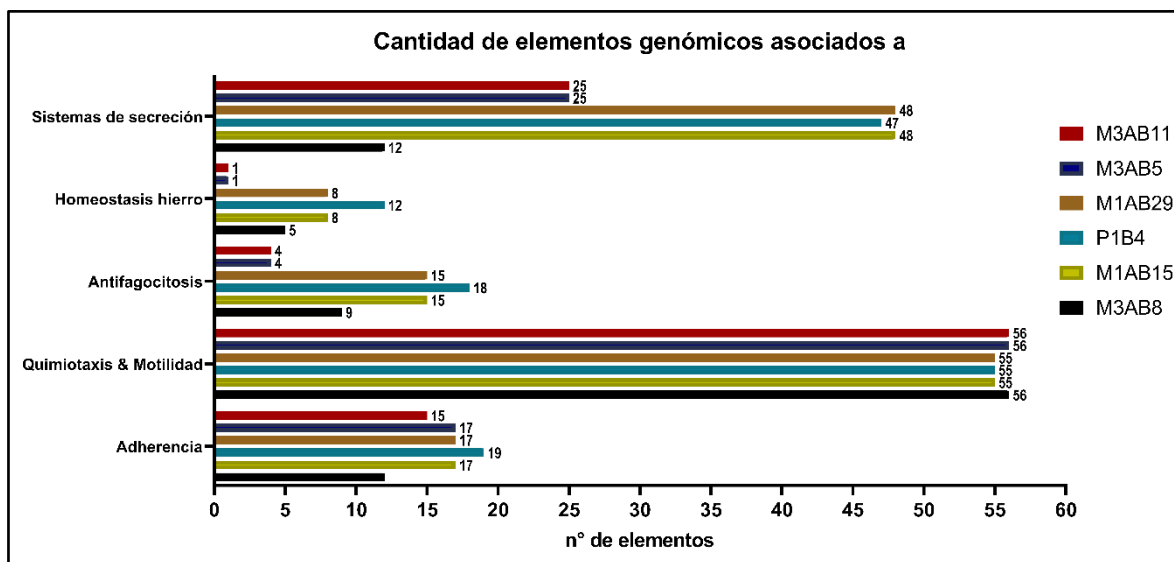


Figura 8. Gráfica comparativa de la cantidad de elementos asociados a distintos factores de virulencia presente en los genomas de los aislados vibrios de este estudio.

Además de los factores de virulencia mencionados anteriormente, los aislados estudiados presentan otras características asociadas con patogenicidad. Entre estas, destaca la hemolisina termolábil *tlh* que ha sido descrita en varias especies de vibrios, entre ellas *V. parahemolyticus* (Acceso E2FUM0, Gutierrez *et al.*, 2013; Yañez *et al.*, 2015), y la cual está presente en todos los aislados analizados. Además de la hemolisina *tlh*, hay genes asociados a *quorum-sensing* que también están presentes en el genoma de todos los aislados. Uno de estos es el gen *luxS*, el cual está incluido en el operón *lux* y está involucrado con la síntesis del autoinductor 2 (AI-2), el cual es secretado por la bacteria y usado para la comunicación celular (Kim *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2008). También está el gen *cqsA*, el cual está involucrado en la producción de la molécula señal CAI-1, de gran importancia en la señalización de *V. cholerae*, y en la regulación de la morfología de las colonias bacterianas (Kelly *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2011). Además de estos genes que están presentes en todos los aislados, hay algunas características que son exclusivas para ciertos aislados. Por ejemplo, tanto M3AB11 como M3AB5, presentan el gen *vvhA* que codifica para la hemolisinaA/citolisina y ha sido reportado en especies patógenas como *V. vulnificus* (Lee *et al.*, 2000; Panicker & Bej, 2005;

Yuan *et al.*, 2020). Por otro lado, el aislado P1B4, es el único que presenta los genes *aerA/act* y *eno*, que codifican para una aerolisina y para una enolasa, respectivamente. La aerolisina presente en P1B4, es proveniente de *Aeromonas hydrophila*, y codifica para una enterotoxina citotóxica que es secretada y forma poros en las membranas de los hospederos (González-Serrano *et al.*, 2002). Por su parte, el gen codificante para la enolasa de origen estreptococal y que cataliza la conversión reversible de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, reacción esencial para la degradación de carbohidratos en la glicolisis (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2003). El aislado M1AB29, presenta un elemento homólogo a un gen de *Pseudomonas sp.*, asociado a la producción la fitotoxina coronatina. Esta toxina está involucrada en la virulencia en plantas ya que promueven la inhibición de la acumulación de ácido salicílico en la respuesta inmune ante patógenos (Mittal & Davis, 1995; Brooks *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2012). Los aislados M3AB11, M3AB5, P1B4 y M3AB8 presentan el gen *IgtF* que está involucrado en la formación de lipopolisacáridos y es un factor determinante en la virulencia de *Haemophilus influenzae* (Richards *et al.*, 2001; Sun, 2001). Además de los elementos descritos previamente, M1AB29 y M3AB8 presentan el gen *adeG* que está asociado con la formación de biopelículas (He *et al.*, 2015).

Los aislados M3AB11 y M3AB8 presentan los genes *vvp* y *cpsB* que codifican para una metaloproteasa descrita previamente en *V. vulnificus* (Miyoshi *et al.*, 1998; Miyoshi, 2006) y para una fosfatasa involucrada en la regulación de la biosíntesis de polisacáridos proveniente de *Yersinia sp.* y *Klebsiella sp.* (Cozzone, 2005; Lawlor *et al.*, 2006), respectivamente. Por último, los resultados de la anotación de los factores de virulencia indican que tanto el aislado P1B4 como M3AB8 presentan el gen *ureB/G* que codifica para una ureasa proveniente de *Helicobacter sp.* y que está relacionada con la resistencia a ácidos (Stingl *et al.*, 2008). Estos resultados señalan que todos los aislados de este estudio tienen potencial para generar virulencia, siendo el aislado P1B4 el que presenta mayor cantidad de elementos asociados a virulencia. En específico y analizando a qué patógeno están asociados los factores de virulencia encontrados, los resultados permiten inferir que los aislados podrían ser patógenos para humanos, peces y organismos invertebrados.

Además de los factores de virulencia señalados anteriormente, también se identificaron elementos asociados a toxinas y elementos móviles (transposones, islas de patogenicidad, etc). Sobre los elementos asociados a toxinas, se observa que los seis aislados presentan de

forma parcial la proteína reguladora de transmembrana *ToxS* y el activador transcripcional *ToxR*, descrito en varias cepas de vibrios patogénicas. *ToxS* interactúa con el dominio periplasmático de *ToxR*, estimulando la activación del operón *ctxAB* que codifica para la toxina de la cólera (DiRita, 1992; Lin *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 2005). Los aislados M1AB29 y M1AB15 también presentan el gen *zot* que codifica para la toxina zónula occludens, la cual afecta la señalización celular y las uniones estrechas intercelulares (Baudry *et al.*, 1992; Uzzau *et al.*, 1999). Por su parte, el aislado M1AB15 presenta el gen *ace* que codifica para la enterotoxina accesoria de la cólera. Ninguno de los genomas ensamblados presenta los genes *ctxAB* que codifican para la toxina de la cólera. Se observa que todos los aislados, excepto M3AB8, presentan el gen *intI4* que codifica para una integrasa que está asociada con secuencias repetidas de *V. cholerae* (organización gen-VCR) (Faruque *et al.*, 1998; Melano *et al.*, 2002). Los aislados M1AB29, P1B4, M1AB15 y M3AB8 presentan el transposón Tn552 (descrito en *Staphylococcus sp.*), el cual está involucrado en procesos de integración de ADN (Rowland & Dyke, 1990). Por último, los seis aislados bacterianos presentan elementos relacionados con islas de patogenicidad de SaPI presentes también en *Staphylococcus sp.* Por otro lado, P1B4 es el único aislado bacteriano que presenta la región *tagA*, la cual se ha descrito que está codificada en la isla de patogenicidad VPI asociada al género *Vibrio* (Szabady *et al.*, 2011) (Figura 9).

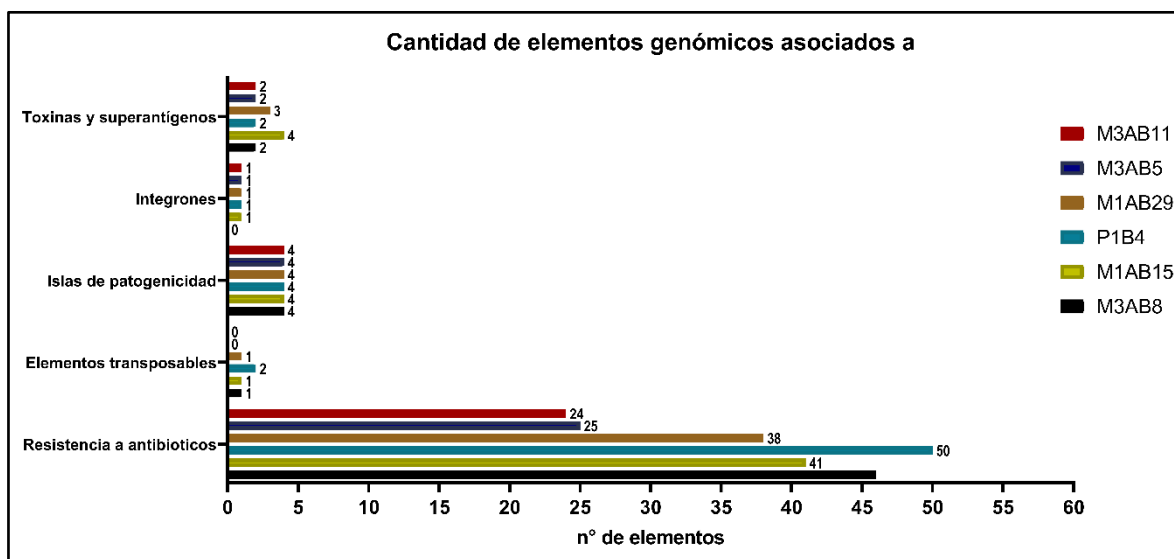


Figura 9. Gráfica comparativa de la cantidad de elementos asociados a toxinas y superantígenos, integrones, islas de patogenicidad y elementos transposables presentes en los genomas de los aislados secuenciados.

La anotación de genes relacionados con resistencia a compuestos tóxicos y antimicrobianos indica que todos los aislados presentan genes de resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos y penicilina. Además, los aislados M3AB11, M3AB5, M1AB29 y M1AB15 presentan genes de resistencia a antisépticos y desinfectantes (Tabla 13).

Tabla 13. Presencia de genes de resistencia a antibióticos en los genomas secuenciados. El signo ✓ indica la presencia del gen correspondiente.

Gen	Resistencia a	M3AB11	M3AB5	M1AB29	P1B4	M1AB15	M3AB8
<i>AdeF</i>	Fluoroquinolonas, Tetraciclina	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>CRP</i>	Macrólidos, Fluoroquinolonas, Penam	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>QacJ</i>	Desinfectantes y antisépticos	✓	✓	-	-	-	-
<i>qacG</i>	Desinfectantes y antisépticos	-	-	✓	-	✓	-
<i>CARB-2</i>	Penam	-	-	✓	-	✓	-
<i>parE (E. coli) D476N</i>	Fluoroquinolonas	-	-	✓	✓	✓	-
<i>TxR</i>	Tetraciclina	-	-	-	-	✓	-
<i>QnrS2</i>	Fluoroquinolonas	-	-	-	-	-	✓

Además de los genes mencionados anteriormente, los genomas de los aislados presentan genes de resistencia a metales y otros compuestos tóxicos, tales como cobre, cobalto, zinc y al antiséptico acraflavina. En el caso de los aislados P1B4 y M1AB5, sus genomas presentan el gen *fosA*, relacionado con resistencia a fosfomicina (Bernat *et al.*, 1997). Por su parte, el aislado M3AB8 presenta elementos genómicos del tipo reductasa relacionados con resistencia a mercurio. Los resultados sugieren que estos aislados de vibrios podrían ser un potencial reservorio de genes de resistencia a elementos tóxicos y antimicrobianos.

Por último, los resultados indican que todos los aislados, excepto M3AB8, presentan regiones asociadas a profagos que están conservadas íntegramente. En total se identificaron regiones del genoma asociadas a cinco tipos de profagos. El largo de estas regiones varía entre los 7 kb hasta los 53 kb dependiendo del tipo de profago. Los profagos más frecuentes son *Vibrio_VP882* y *Vibrio_K139* presentes en más de la mitad de los genomas analizados. Pese a que M1AB15 es el aislado con más potenciales profagos intactos, ninguno de los profagos

en su genoma fue encontrado también en el genoma de los otros aislados. Todos los profagos identificados han sido descritos originalmente en bacterias del género *Vibrio*, exceptuando al profago *Enterobacter_SfV* del aislado M1AB15, el cual fue descrito originalmente en *Shigella flexneri*. La Tabla 14 muestra el detalle de todas las regiones asociadas a profagos encontradas en el genoma de los aislados de *Vibrio*.

Tabla 14. Profagos presentes en los genomas de los aislados secuenciados. Se consideraron únicamente los profagos conservados íntegramente. Datos obtenidos mediante la herramienta PHASTER.

Aislado	Posición	Largo (kb)	N° de proteínas	% GC	Profago más probable	Acceso
M3A B11	Contig 5	31,0	23	45,6	Vibrio_VP882	NC_009016
	Contig 4	53,1	42	45,2	Vibrio_K139	NC_003313
M3A B5	Contig 4	44,0	52	44,5	Vibrio_VP882	NC_009016
	Contig 7	47,2	42	45,1	Vibrio_K139	NC_003313
M1A B29	Contig 5	31,0	23	45,6	Vibrio_VP882	NC_009016
	Contig 4	53,1	42	45,2	Vibrio_K139	NC_003313
P1B4	Contig 5	37,7	38	43,4	Vibrio_K139	NC_003313
M1A B15	Contig 3	7,6	11	46,4	Vibrio_VfO3K6	NC_002362
	Contig 4	35,3	47	46,7	Enterobacter_SfV	NC_003444
	Contig 10	43,0	68	48,9	Vibrio_vB_VpaM_MAR	NC_019722

En la Figura 10, se puede observar un mapa de los profagos de mayor y menor tamaño encontrados en los distintos aislados (Profago 1 de M1AB15, y Profago 1 de P1B4) en comparación al fago más cercano presente en la base de datos. Además, se presenta el profago 3 de la cepa M1AB15, similar al bacteriófago SfV proveniente de *S. flexneri*, único que no se encontró en otros genomas del género *Vibrio*. Se observa que hay homología entre la región presente en los genomas de los aislados estudiados y su respectivo fago más probable.

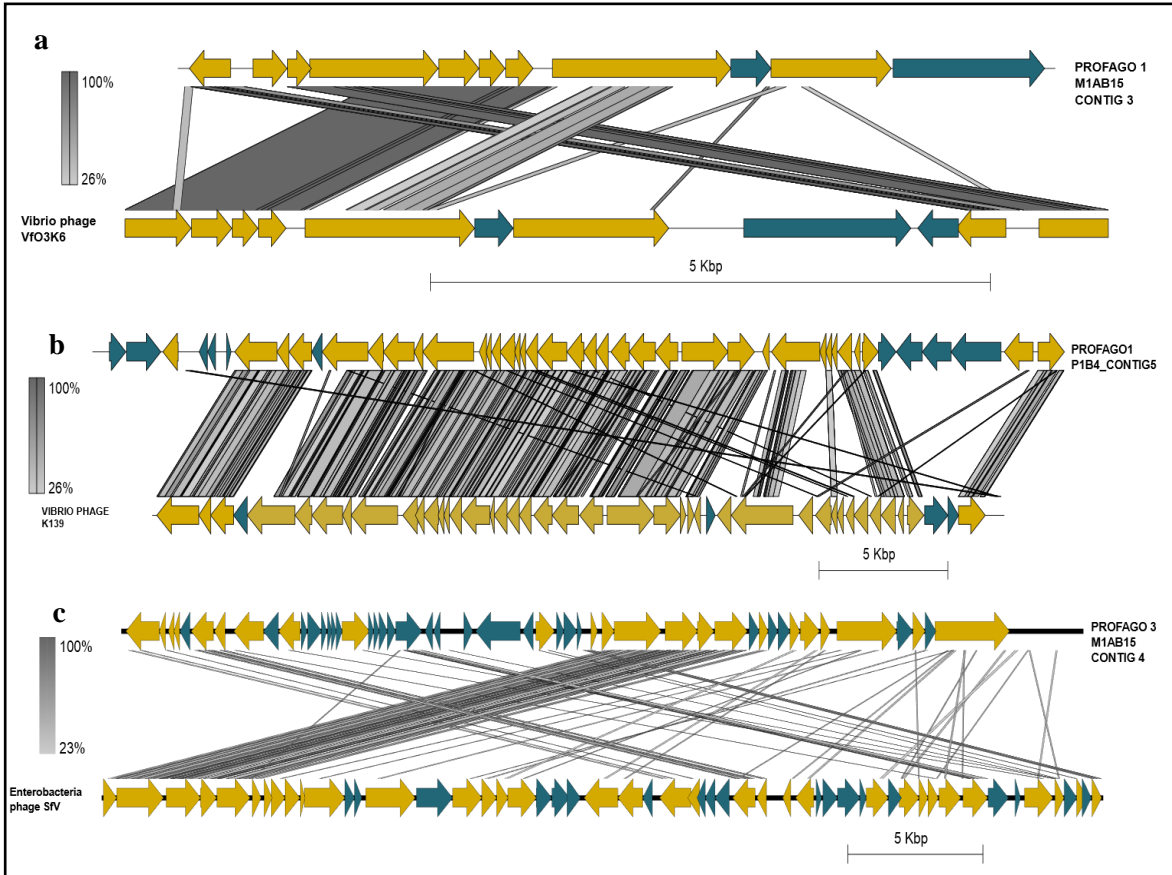


Figura 10. Mapeo de las regiones identificadas como profagos con el fago de referencia más cercano. Se muestra la región más pequeña (a), la de mayor tamaño (b) y la región del profago proveniente de *Enerobacteria sp.* (c). Figura creada con Easyfig.

5. DISCUSIÓN

Este trabajo consistió en el análisis de varios aislados ambientales de vibrios provenientes de la zona sur de Chile, los cuales fueron obtenidos de muestras de tejido blando de chorito chileno y de muestras de agua marina de las costas de Quillaipe. Inicialmente se realizó una comparación entre los distintos aislados de *Vibrio* por ARDRA. Los resultados mostraron que en todos los casos se amplifica una banda de gran intensidad de aproximadamente 1.500 pb, que concuerda con lo esperado para la amplificación del gen del *ARNr 16S*, en bacterias en general, y en el género *Vibrio* en particular (Dorsch *et al.*, 1992; Chun *et al.*, 1999). La digestión de los productos amplificados del gen del *ARNr 16S* generaron seis ribotipos diferentes entre los 17 aislados de vibrios analizados. Al contrastar esta clasificación con la identidad asignada a cada aislado de *Vibrio* a partir de sus genomas se observan algunas discrepancias. Por un lado, los aislados M3AB11 y M3AB5 presentan distinto ribotipo, sin embargo, ambos fueron identificados como *V. pacinii*. Esto sugiere que la técnica ARDRA posiblemente permite discernir entre algunas cepas de este clado en base a su ribotipo. Esto concuerda con resultados reportados en bacterias de los géneros *Clostridium*, *Vibrio*, entre otros (Hasan *et al.*, 2017; Brightwell & Horváth, 2018). Por el contrario, si observamos los aislados del clado harveyi podemos notar que los aislados P1B4 y M1AB15 presentan el mismo ribotipo, pero fueron identificados como *V. jasicida* y *V. diabolicus*, respectivamente. El aislado M1AB29 también fue identificado como una especie del clado harveyi, sin embargo, presenta un ribotipo distinto al de los dos aislados anteriores. Esto es consistente con lo reportado sobre lo difícil que es discriminar especies de vibrios del clado harveyi (Huei-Mien *et al.*, 2018). Al contrario del caso anterior, estos resultados sugieren que la técnica ARDRA en algunos casos no es capaz de discriminar entre dos miembros del mismo clado. Estos resultados demuestran las limitantes respecto de la resolución que permite la técnica ARDRA. Sin embargo, los resultados indican que esta sí permitiría discriminar entre especies de vibrios pertenecientes a distintos clados, ya que, no se observó que aislados de distintos clados tuvieran el mismo ribotipo. Es posible que la incorporación de más enzimas de restricción permita optimizar la resolución de la técnica ARDRA en la clasificación de estos aislados de *Vibrio* de origen ambiental.

El largo total de los ensamblajes va aproximadamente desde los 5 millones hasta los 6,2 millones de pb y se observa una composición de GC entre 43% y 45%, lo que concuerda con datos de genomas de vibrios ambientales descritos en la literatura (BioProject PRJNA234841, PRJNA231221, PRJDB3039, PRJNA274607, PRJNA534035). Las estadísticas de los ensamblajes *de novo* y la referencia (ver desde la Tabla S2 a S7 de ANEXOS) señalan que la estrategia de ensamblaje *de novo* fue la más adecuada para los seis aislados representativos secuenciados.

En este estudio se utilizaron distintas herramientas para identificar las especies de cada aislado. Todas estas aproximaciones arrojaron resultados similares, salvo para el caso del aislado M1AB15. Como se observa en la Tabla 11, el aislado M1AB15 fue identificado como *V. diabolicus* mediante MLSA y dicha identificación corroborada por el método ANI, sin embargo, fue identificado como *V. alginolyticus* por la herramienta SpeciesFinder. Un aspecto que podría explicar los resultados obtenidos se refiere a la filogenia del clado harveyi. En este caso, la discrepancia puede deberse al conjunto de marcadores genéticos utilizados para comparar la identidad de los aislados junto con la gran similitud que hay entre especies del clado harveyi, donde se ha descrito que los eventos de especiación son el resultado de una diversificación estocástica de poblaciones locales, los cuales son influenciados por múltiples eventos evolutivos (Huei-Mien *et al.*, 2018). De todos modos, la identidad de la especie determinada por el MLSA fue corroborada mediante el método ANI, obteniendo valores por sobre el 97%. Esto indica que la metodología empleada permite identificar algunas especies de vibrios aisladas desde muestras ambientales. Por estudios previos que han comparado distintas herramientas para identificar bacterias (Gabriel *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2021) y los valores orthoANI obtenidos, se determinó que la clasificación mediante MLSA sigue siendo la más adecuada para el caso de los vibrios. Es decir, los aislados M3AB11 y M3AB5 corresponden a *V. pacinii*, M1AB29 corresponde a *V. alginolyticus*, el aislado P1B4 corresponde a *V. jasicida* y M3AB8 corresponde a *V. cyclitrophicus*. En base a la clasificación por ARDRA y a la identificación de los aislados secuenciados se sugiere que el aislado P1B6 correspondería a la especie *V. jasicida*. Los aislados M1AB1, M1AB3, M1AB9, M1AB14, M1AB23 y M1AB24 corresponderían a *V. diabolicus*. Los aislados M1AB8 y M1AB27 corresponderían a *V. alginolyticus*. Los aislados M3AB5 y M3AB11 corresponderían a la especie *V. pacinii*. La identidad de los aislados no secuenciados debe

ser confirmada mediante análisis filogenéticos tal como se realizó en este trabajo. Finalmente, la identidad del aislado M1AB9 no pudo ser determinada debido a que era el único miembro del grupo V y no se contó con la secuencia de su genoma para los análisis de identidad.

La anotación de los genomas indica que los aislados bacterianos del mismo clado tienen más similitud entre ellos que con los miembros de otros grupos. Se observa que todos los aislados analizados son potencialmente virulentos, ya que presentan factores de virulencia característicos de este género, asociados a la motilidad, adherencia, antifagocitosis, sistemas de secreción, entre otros. Además, se detectan genes que han sido reportados en bacterias de otros géneros como *Yersinia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Helicobacter sp.*, *Staphylococcus sp.*, entre otras (Rowland & Dyke, 1990; Richards *et al.*, 2001; Sun, 2001; Cozzone, 2005; Lawlor *et al.*, 2006; Stingl *et al.*, 2008). También se identificaron diversos genes que codifican proteínas involucradas en la resistencia de compuestos tóxicos y antibióticos. Entre estos genes hay algunos de metabolismo de cobre, arsénico, cobalto y zinc. El aislado M3AB8 destaca debido a que presenta genes relacionados con resistencia a mercurio y arsénico, además de otros genes asociados con resistencia a ácidos y que favorecen la colonización. Esto es de interés ya que se ha reportado el potencial que pueden tener las bacterias del género *Vibrio* en biorremediación (Afrasyab *et al.*, 2007; Matyar, 2012; Saranya *et al.*, 2017; Sinha & Khare, 2012; Soni *et al.*, 2019; Wagner-Dobler, 2003).

En relación con los sistemas de secreción, los resultados indican que los seis aislados estudiados presentan genes relacionados con el sistema de secreción extracelular de proteínas (EPS) T2SS, el cual se ha descrito como un sistema de secreción general presente en bacterias del género *Vibrio* (Robien *et al.*, 2003; Sloup *et al.*, 2017). Por otro lado, el gen *virF* asociado al T3SS1 (codificante para un activador transcripcional asociado con virulencia) y que ha sido descrito en algunas bacterias patógenas para humanos como *Shigella sp.* (Acceso Q7BCK4; Tobe *et al.*, 1993; Prosseda *et al.*, 1998) y también en algunas especies de vibrios como *V. splendidus* (Acceso A0A0H3ZTC9) está presente en los aislados M1AB29, P1B4 y M1AB15. Por su parte, los aislados del clado M3AB11 y M3AB5 (y en menor cantidad P1B4) presentan genes asociados con el sistema VAS T4SS que también ha sido reportado previamente en bacterias patógenas (Pukatzki *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2012). Los resultados

indican que los aislados recolectados pueden actuar potencialmente como reservorios de factores de virulencia y de genes de resistencia a compuestos tóxicos.

Con respecto a la identificación de profagos, se observa que únicamente el profago similar a *Vibrio_VfO3K6* ha sido descrito como un fago de ADN circular de hebra simple, todos los demás presentan genomas de ADN lineal (Lan *et al.*, 1997; Nesper *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2009; Alanis *et al.*, 2012). Si bien se pudieron identificar diversos elementos genómicos de interés mediante análisis *in silico*, es necesario hacer pruebas experimentales para confirmar si estos genes tienen consecuencias en el fenotipo de las bacterias o no.

Este estudio describe los primeros casos de *V. pacinii* obtenidos desde muestras ambientales en Chile. Previamente, se han reportado cepas de *V. pacinii* no patogénicas (Huang *et al.*, 2018) y otras que han sido descritas como patógenas para el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Austin *et al.*, 1995; Gomez-Gil *et al.*, 2003), en lugares como China, España y Tasmania (Vandenberghe *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 1995). Si bien no se ha reportado que *V. pacinii* sea patógena para seres humanos, sí se ha descrito que puede serlo para especies de peces como el salmón del atlántico, especie que es cultivada ampliamente en Chile donde existen más de mil centros de cultivos en mar, con un promedio de 10 HA de superficie cubierta (SUBPESCA, 2022). Dado el potencial patogénico que *V. pacinii* puede tener en algunas especies de peces y las características y elementos genómicos reportado en los aislados obtenidos de muestras ambientales, un posible brote de las cepas de *V. pacinii* aisladas en este estudio podría generar pérdidas considerables en la industria acuícola. También, es el primer caso de *V. jasicida* proveniente de muestras ambientales reportado en Chile. Previamente, esta especie ha sido aislada de langostas (*Palinurus sp.*), abalones (*Haliotis rufescens*), peces, entre otros, en Australia y Nueva Zelanda (Thompson *et al.*, 2007; Diggles *et al.*, 2000). Esta especie también ha sido aislada desde distintos organismos como, por ejemplo, representantes del fitoplancton (Dubert *et al.*, 2015). Esto podría generar un problema sanitario dado que el fitoplancton es un reservorio de vibrios y es esencial en las cadenas tróficas de los ecosistemas marinos, además de estar involucrado en eventos de marea roja, los cuales afectan directamente a la población humana (Minagawa & Wade, 1986; Karunasagar *et al.*, 1996; Turner *et al.*, 2009). Por su parte, se han reportado casos previos de *V. diabolicus* (Acceso NCTH000000000), *V. alginolyticus* (ISP, 2009; Yañez *et*

al., 2015) y *V. cyclitrophicus* (Shah *et al.*, 2014) en Chile. En el caso de *V. diabolicus*, se han reportado aislamientos desde el tracto digestivo de *Artemia franciscana* donde se indicó que esta bacteria estaría relacionada con la acumulación de polihidroxitirato (Yevenes *et al.*, 2021). Por otro lado, no es el primer caso de *V. alginolyticus* aislada desde muestras ambientales de las costas de Quillaípe, ya que previamente se reportó la presencia de hemolisina *tlh* encontrada en este estudio (Yañez *et al.*, 2015). Además, se han reportado casos de *V. alginolyticus* aislados desde granjas de peces como el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) y la trucha (*Oncorhynchus sp.*) (Ruiz *et al.*, 2015), lo que podría significar problemas de sanidad y pérdidas económicas en la industria. Se han reportado casos previos de *V. cyclitrophicus* en granjas de salmón en el sur de Chile, donde se observó gran presencia de genes relacionados a resistencia a antimicrobianos, lo que es una gran problemática considerando la aparición de nuevas cepas super resistentes a antibióticos. Considerando los factores de virulencia presentes en los aislados bacterianos y reportes previos de patogénesis de las especies identificadas, se puede inferir que los aislados pertenecientes a *V. pacinii* podrían ser patógenos para animales como camarones (*Penaeus sp.*) y otros invertebrados (Gómez-Gil *et al.*, 2003). El aislado perteneciente a *V. alginolyticus* podría ser potencialmente patógeno para humanos considerando también que esta especie es cercana filogenéticamente a otras que son patógenas para humanos como *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (Chart, 2012). El aislado perteneciente a la especie *V. jasicida* tiene características que podrían hacerlo potencialmente patógeno para invertebrados como crustáceos y moluscos (Harrison *et al.*, 2022). Por su parte, el aislado de *V. diabolicus* podría ser patógeno para moluscos (Turner *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2020). Por último, el aislado perteneciente a *V. cyclitrophicus* podría ser potencialmente patógeno para organismos invertebrados (Deng *et al.*, 2009; Pérez-Cataluña *et al.*, 2016). Esto tiene que ser confirmado con ensayos de patogenicidad de los aislados considerados en este estudio.

El análisis realizado permitió identificar la especie de los aislados de *Vibrio*, clasificarlos en clados según sus relaciones taxonómicas y analizar los elementos de interés presentes en sus genomas. La identificación de especies potencialmente patógenas y la presencia de factores de virulencia y resistencia en sus genomas, refuerza la importancia de mantener un monitoreo en las poblaciones ambientales de vibrios. Se espera que este trabajo ayude a entender las comunidades de vibrios que habitan las costas del sur de Chile, además de dar una idea del

potencial que pueden tener estas bacterias como reservorios factores de virulencia y de genes de resistencia a compuestos tóxicos.

6. CONCLUSIONES

- ❖ La técnica ARDRA permite clasificar y diferenciar aislados ambientales del género *Vibrio* de distintos clados y, en algunos casos, del mismo clado. Se obtuvieron seis ribotipos entre los 17 aislados analizados.
- ❖ Los aislados ambientales de cepas del género *Vibrio* recolectados en el sur de Chile portan distintos factores de virulencia por lo que podrían ser potencialmente patógenas para distintos organismos.
- ❖ Los aislados ambientales del género *Vibrio* analizados portan genes de resistencia a antimicrobianos como tetraciclina, macrólidos, fluoroquinolonas y penicilina, por lo que son potencialmente resistentes a estos compuestos.
- ❖ Se identificaron regiones relacionados con elementos móviles como islas de patogenicidad y transposones, además de profagos, sugiriendo que estas bacterias han experimentado eventos de transferencia de material genético.
- ❖ Los aislados ambientales recolectados corresponden a las especies *V. pacinii*, *V. alginolyticus*, *V. jasicida*, *V. diabolicus* y *V. cyclitrophicus*. Siendo los primeros aislados reportados de *V. pacinii* y *V. jasicida* en Chile.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alcock, B.P., Raphenya, A.R., Lau, T.T.Y., Tsang, K.K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.V., Cheng, A.A., Liu, S., Min, SY., Miroshnichenko, A., Tran, H.K., Werfalli, R.E., Nasir, J.A., Oloni, M., Speicher, D.J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A.N., Bordeleau, E., Pawlowski, AC., Zubyk, HL., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, GL., Beiko, R.G., Brinkman, F.S.L., Hsiao, W.W.L., Domselaar, G.V. & McArthur, A.G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 48, D517-D525.

Adeleye, I. A., Daniels, F. V., & Enyinnia, V. A. (2010). Characterization and pathogenicity of *Vibrio spp.* contaminating seafoods in Lagos, Nigeria. *Internet Journal of Food Safety*, 12, 1-9.

Afrasyab, S., Yasmin, A., & Hasnain, S. (2002). Characterization of Some Indigenous Mercury Resistant. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(7), 792-797.

Alanis Villa, A., Kropinski, A. M., Abbasifar, R., & Griffiths, M. W. (2012). Complete genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage *vB_VpaM_MAR*.

Altekruse, S. F., Bishop, R. D., Baldy, L. M., Thompson, S. G., Wilson, S. A., Ray, B. J., & Griffin, P. M. (2000). *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiology & Infection*, 124(3), 489-495.

Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16–W21.

Arteaga, M., Velasco, J., Rodriguez, S., Vidal, M., Arellano, C., Silva, F., ... & Montero, D. A. (2020). Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018. *Microbial genomics*, 6(3).

Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A. & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming *Vibrio sp.*: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*.

Austin, B., Alsina, M., Austin, D. A., Blanch, A. R., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J. L., Pedersen, K., Tiainen, T., Verdonck, L. & Swings, J. (1995).

Identification and typing of *Vibrio anguillarum*: a comparison of different methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(2), 285-302.

Austin, B. (2005). Bacteria pathogens of marine fish. In *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment* (Belkin, S. and Colwell, R.R., eds), pp. 391–413, Kluwer.

Bacian, C., Verdugo, C., García, K., Perez-Larruscain, J., De Blas, I., Cachicas, V., & Lopez-Joven, C. (2021). Longitudinal Study of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (tdh+ and/or trh+) in Two Natural Extraction Areas of *Mytilus chilensis* in Southern Chile. *Frontiers in Microbiology*, 12, 621737.

Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: a European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, 2(1), 7-18.

Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Taylor, N. G., Hartnell, R., Siitonen, A., & Martinez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3(1), 73-77.

Baker-Austin, Craig, et al. "Non-cholera vibrios: the microbial barometer of climate change." *Trends in microbiology* 25.1 (2017): 76-84.

Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-19.

Baross, J., & Liston, J. (1970). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Applied microbiology*, 20(2), 179-186.

Baudry, B., Fasano, A., Ketley, J., & Kaper, J. B. (1992). Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 60(2), 428-434.

Beijerinck, M. W. (1886). *Beobachtungen und Betrachtungen über Wurzelknospen und Nebenwurzeln* (Vol. 25). J. Müller.

Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2001). α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin (ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular microbiology*, 40(6), 1273-1287.

Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2003). Identification of a novel plasmin (ogen)-binding motif in surface displayed α -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology*, 49(2), 411-423.

Bernat, B. A., Laughlin, L. T., & Armstrong, R. N. (1997). Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases. *Biochemistry*, 36(11), 3050-3055.

Birkbeck, T. H., & Treasurer, J. W. (2014). *Vibrio splendidus*, *Vibrio ichthyenteri* and *Vibrio pacinii* isolated from the digestive tract microflora of larval ballan wrasse, *Labrus bergylta* Ascanius, and goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37(1), 69-74.

Bouvier, T., & Del Giorgio, P. A. (2007). Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition. *Environmental microbiology*, 9(2), 287-297.

Boyd, E. F., K. E. Moyer, L. Shi, and M. K. Waldor. 2000. Infectious CTX ϕ and the vibrio pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect. Immun.* 68:1507–1513.

Brightwell, G., & Horváth, K. M. (2018). Molecular discrimination of New Zealand sourced meat spoilage associated psychrotolerant *Clostridium* species by ARDRA and its comparison with 16s RNA gene sequencing. *Meat science*, 138, 23-27.

Brock, T. D. (1988). *Robert Koch: a life in medicine and bacteriology* (pp. 96-104). Madison, WI: Science Tech Publishers.

Brockhurst, M. A., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2005). The effect of a bacteriophage on diversification of the opportunistic bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1570), 1385-1391.

Brooks, D. M., Bender, C. L., & Kunkel, B. N. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology*, 6(6), 629-639.

Campos, J., Martínez, E., Suzarte, E., Rodríguez, B. L., Marrero, K., Silva, Y., Ledon, T., del Sol, R. & Fando, R. (2003). VGJ Φ , a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX Φ . *Journal of bacteriology*, 185(19), 5685-5696.

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., & Brüssow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Current opinion in microbiology*, 6(4), 417-424.

- Cavallo, R. A., & Stabili, L. (2002). Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). *Water Research*, 36(15), 3719-3726.
- Chang, B., Taniguchi, H., Miyamoto, H., & Yoshida, S. I. (1998). Filamentous bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus* as a possible clue to genetic transmission. *Journal of bacteriology*, 180(19), 5094-5101.
- Chang, B., Miyamoto, H., Taniguchi, H., & Yoshida, S. I. (2002). Isolation and genetic characterization of a novel filamentous bacteriophage, a deleted form of phage f237, from a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O4: K68 strain. *Microbiology and immunology*, 46(8), 565-569.
- Chart, H. (2012). *Vibrio*, mobiluncus, gardnerella and spirillum: Cholera; vaginosis; rat bite fever. In *Medical Microbiology* (pp. 314-323). Churchill Livingstone.
- Chevallereau, A., Pons, B. J., van Houte, S., & Westra, E. R. (2022). Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20(1), 49-62.
- Chenna, R. (2003). Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, and Thompson JD. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, 31, 3497-3500.
- Chibani, C. M., Roth, O., Liesegang, H., & Wendling, C. C. (2020). Genomic variation among closely related *Vibrio alginolyticus* strains is located on mobile genetic elements. *BMC genomics*, 21(1), 1-14.
- Chun, J., Huq, A., & Colwell, R. R. (1999). Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 2202-2208.
- Chun, J., Rivera, I. N., & Colwell, R. R. (2002). Analysis of 16S–23S rRNA intergenic spacer of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* for detection of these species. In *Gene Probes* (pp. 171-178). Humana Press, Totowa, NJ.
- Clark, C. A., Purins, L., Kaewrakon, P., & Manning, P. A. (1997). VCR repetitive sequence elements in the *Vibrio cholerae* chromosome constitute a mega-integron. *Molecular microbiology*. 26(5), 1137-1138.

Cockburn, Thomas A., and James G. Cassanos. "Epidemiology of endemic cholera." *Public health reports* 75.9 (1960): 791.

Colquhoun, D. J., Aase, I. L., Wallace, C., Baklien, A., & Gravningen, K. (2004). First description of *Vibrio ordalii* from Chile. *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 24(4), 185-188.

Colwell, R. R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(2), 121-125.

Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R. R., Pommepuy, M., & Hervio-Heath, D. (2007). Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation?. *The ISME Journal*, 1(2), 111-120.

Cozzone, A. J. (2005). Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. *Microbial Physiology*, 9(3-4), 198-213.

Davis, B. R., Fanning, G. R., Madden, J. M., Steigerwalt, A. G., Bradford Jr, H. B., Smith Jr, H. L., & Brenner, D. J. (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *Journal of clinical microbiology*, 14(6), 631-639.

Davis, B. J., Jacobs, J. M., Davis, M. F., Schwab, K. J., DePaola, A., & Curriero, F. C. (2017). Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*, 83(21), e01147-17.

Dechet, A. M., Yu, P. A., Koram, N., & Painter, J. (2008). Nonfoodborne *Vibrio* infections: an important cause of morbidity and mortality in the United States, 1997–2006. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 970-976.

Deng, H., He, C., Zhou, Z., Liu, C., Tan, K., Wang, N., ... & Liu, W. (2009). Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aquaculture*, 287(1-2), 18-27.

DePaola, A., Hopkins, L. H., Peeler, J. T., Wentz, B., & McPhearson, R. (1990). Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* in US coastal waters and oysters. *Applied and environmental microbiology*, 56(8), 2299-2302.

Didelot, X. (2010). Sequence-Based Analysis of Bacterial Population Structures. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*, 37-60.

Diggles, B. K., Moss, G. A., Carson, J., & Anderson, C. D. (2000). Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of aquatic organisms*, 43(2), 127-137.

Dijkshoorn, L., Towner, K. J., & Struelens, M. (Eds.). (2001). *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. Elsevier.

DiRita, V. J. (1992). Co-ordinate expression of virulence genes by ToxR in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*, 6(4), 451-458.

Dorsch, M., Lane, D., & Stackebrandt, E. (1992). Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 58-63.

Dubert, J., Fernández-Pardo, A., Nóvoa, S., Barja, J. L., & Prado, S. (2015). Phytoplankton production systems in a shellfish hatchery: variations of the bacterial load and diversity of vibrios. *Journal of applied microbiology*, 118(6), 1264-1275.

Edgar, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113 (2004).

Eilers, H., Pernthaler, J., Glöckner, F. O., & Amann, R. (2000). Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 3044-3051.

Eilers, H., Pernthaler, J., & Amann, R. (2000). Succession of pelagic marine bacteria during enrichment: a close look at cultivation-induced shifts. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4634-4640.

Engebrecht, J., Nealson, K., & Silverman, M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell*, 32(3), 773-781.

Eyisi, O. A., Nwodo, U. U., & Iroegbu, C. U. (2013). Distribution of *Vibrio* species in shellfish and water samples collected from the Atlantic coastline of south-east Nigeria. *Journal of health, population, and nutrition*, 31(3), 314.

FAO-USP, FDA-USA, Centro i-Mar, U. los Lagos e Instituto de Salud Pública de Chile Presencia de especies de vibrio en alimentos de origen marino en Chile, 2009.

Farmer, J. J. (2005). Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411[^]. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 494-546.

Farris JS. The logical basis of phylogenetic analysis. Vol. 2. Bronx, New York: New York Botanical Garden; 1983. pp. 7–36.

Faruque, S. M., Albert, M. J., & Mekalanos, J. J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(4), 1301-1314.

Finkelstein, R., Edelstein, S., & Mahamid, G. (2002). Fulminant wound infections due to *Vibrio vulnificus*. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*, 4(8), 654-655.

Gabriel, M. W., Matsui, G. Y., Friedman, R., & Lovell, C. R. (2014). Optimization of Multilocus Sequence Analysis for Identification of Species in the Genus *Vibrio*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5359–5365. doi: 10.1128/aem.01206-14.

García, K., Torres, R., Uribe, P., Hernández, C., Rioseco, M. L., Romero, J., & Espejo, R. T. (2009). Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7482-7487.

Gevers, D., Vandepoele, K., Simillion, C., & Van de Peer, Y. (2004). Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends in microbiology*, 12(4), 148-154.

Giovannoni, S. J. (2000). Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. *Microbial ecology of the oceans*, 47-84.

Gomez-Gil, B., Thompson, F. L., Thompson, C. C., & Swings, J. (2003). *Vibrio pacinii* sp. nov., from cultured aquatic organisms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1569-1573.

Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F. L., & Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*, 150(6), 1769-1777.

González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Rioseco, M. L., Vergara, J. A., Cabello, F., ... & Espejo, R. T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging infectious diseases*, 11(1), 129.

- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Grim, C. J., Hasan, N. A., Taviani, E., Haley, B., Chun, J., Brettin, T. S., ... & Colwell, R. R. (2010). Genome Sequence of Hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and Comparative Genomics with *V. cholerae*. *Journal of bacteriology*, 192(13), 3524-3533.
- Grimes, D. J., Johnson, C. N., Dillon, K. S., Flowers, A. R., Noriega, N. F., & Berutti, T. (2009). What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean—a review. *Microbial ecology*, 58(3), 447-460.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Gutierrez West, C. K., Klein, S. L., & Lovell, C. R. (2013). High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary. *Applied and environmental microbiology*, 79(7), 2247–2252.
- Harth, E., Matsuda, L., Hernández, C., Rioseco, M. L., Romero, J., González-Escalona, N., ... & Espejo, R. T. (2009). Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, southern Chile. *Emerging infectious diseases*, 15(2), 163.
- He, X., Lu, F., Yuan, F., Jiang, D., Zhao, P., Zhu, J., ... & Lu, G. (2015). Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(8), 4817-4825.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, & O. White. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–483.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K., & De Vos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, 26(3), 247-259.
- Higgins, D. G., & Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73(1), 237-244.

Hirono, I., Masuda, T., & Aoki, T. (1996). Cloning and detection of the hemolysin gene of *Vibrio anguillarum*. *Microbial pathogenesis*, 21(3), 173-182.

Hossain, S., Wickramanayake, M. V. K. S., Dahanayake, P. S., & Heo, G. J. (2020). Occurrence of virulence and extended-spectrum β -lactamase determinants in *Vibrio* spp. isolated from marketed hard-shelled mussel (*Mytilus coruscus*). *Microbial Drug Resistance*, 26(4), 391-401.

Huang, J., Zeng, B., Liu, D., Wu, R., Zhang, J., Liao, B., ... & Bian, F. (2018). Classification and structural insight into vibriolysin-like proteases of *Vibrio* pathogenicity. *Microbial pathogenesis*, 117, 335-340.

Hubbard, T. P., Chao, M. C., Abel, S., Blondel, C. J., Zur Wiesch, P. A., Zhou, X., ... & Waldor, M. K. (2016). Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6283-6288.

Hueck, C. J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 379-433.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., ... & Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142(7), 1881-1893.

Janssen, P. J. (2001). Selective Restriction Fragment Amplification by AFLP™. In *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data* (pp. 177-210). Elsevier Science BV.

Jenkins, P. H., Montejano, H. J., Abbasi, M. J., Crowley, M. S., O'Brien, M. G., Conte, V., ... & Merlo, E. (2010). Update on cholera-Haiti, Dominican Republic, and Florida, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59(50), 1637-1641.

Jiang, S. C., Louis, V., Choopun, N., Sharma, A., Huq, A., & Colwell, R. R. (2000). Genetic diversity of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and environmental microbiology*, 66(1), 140-147.

Johnson, C. N., Bowers, J. C., Griffitt, K. J., Molina, V., Clostio, R. W., Pei, S., ... & Colwell, R. R. (2012). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied and environmental microbiology*, 78(20), 7249-7257.

- Julie, D., Solen, L., Antoine, V., Annick, D., & Dominique, H. H. (2010). Ecology of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* on the French Atlantic coast. Effects of temperature, salinity, turbidity and chlorophyll a. *Environmental microbiology*, 12(4), 929-937.
- Kar, S., Ghosh, R. K., Ghosh, A. N., & Ghosh, A. (1996). Integration of the DNA of a novel filamentous bacteriophage VSK from *Vibrio cholerae* 0139 into the host chromosomal DNA. *FEMS microbiology letters*, 145(1), 17-22.
- Karaolis, D. K., R. Lan, and P. R. Reeves. 1994. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholerae* isolates. *Journal of Bacteriology* 176:6199–6206.
- Karaolis, D. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B., & Reeves, P. R. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 3134-3139.
- Karunasagar, I., Otta, S. K., & Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture*, 140(3), 241-245.
- Kaspar, C. A., & Tamplin, M. L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and environmental microbiology*, 59(8), 2425-2429.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2014). MAFFT: iterative refinement and additional methods. In *Multiple sequence alignment methods* (pp. 131-146). Humana Press, Totowa, NJ.
- Kauffman, K. M., Hussain, F. A., Yang, J., Arevalo, P., Brown, J. M., Chang, W. K., ... & Polz, M. F. (2018). A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. *Nature*, 554(7690), 118-122.
- Kelly, R. C., Bolitho, M. E., Higgins, D. A., Lu, W., Ng, W. L., Jeffrey, P. D., ... & Bassler, B. L. (2009). The *Vibrio cholerae* quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nature chemical biology*, 5(12), 891-895.
- Kim, S. Y., Lee, S. E., Kim, Y. R., Kim, C. M., Ryu, P. Y., Choy, H. E., ... & Rhee, J. H. (2003). Regulation of *Vibrio vulnificus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Molecular microbiology*, 48(6), 1647-1664.

- Klein, S. L., Gutierrez West, C. K., Mejia, D. M., & Lovell, C. R. (2014). Genes similar to the *Vibrio parahaemolyticus* virulence-related genes *tdh*, *tlh*, and *vscC2* occur in other *Vibrionaceae* species isolated from a pristine estuary. *Applied and environmental microbiology*, 80(2), 595-602.
- Kodama, T., Rokuda, M., Park, K. S., Cantarelli, V. V., Matsuda, S., Iida, T., & Honda, T. (2007). Identification and characterization of *VopT*, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cellular microbiology*, 9(11), 2598-2609.
- Kopprio, G. A., Streitenberger, M. E., Okuno, K., Baldini, M., Biancalana, F., Fricke, A., ... & Lara, R. J. (2017). Biogeochemical and hydrological drivers of the dynamics of *Vibrio* species in two Patagonian estuaries. *Science of The Total Environment*, 579, 646-656.
- Lan, S. F., Huang, C. H., Chang, C. H., Liao, W. C., Lin, I. H., Jian, W. N., ... & Wong, H. C. (2009). Characterization of a new plasmid-like prophage in a pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 strain. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), 2659-2667.
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Lukjancenko, O., Saputra, D., Rasmussen, S., Hasman, H., ... & Lund, O. (2014). Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *Journal of clinical microbiology*, 52(5), 1529-1539.
- Lasa, A., Avendaño-Herrera, R., Estrada, J. M., & Romalde, J. L. (2015). Isolation and identification of *Vibrio toranzoniae* associated with diseased red conger eel (*Genypterus chilensis*) farmed in Chile. *Veterinary Microbiology*, 179(3-4), 327-331.
- Lawlor, M. S., Handley, S. A., & Miller, V. L. (2006). Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infection and immunity*, 74(9), 5402-5407.
- Lee, S. E., Shin, S. H., Kim, S. Y., Kim, Y. R., Shin, D. H., Chung, S. S., ... & Rhee, J. H. (2000). *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vhA*. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3405-3415.
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Nicolas, J. L., Gouy, M., & Berthe, F. (2004). Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. *Diseases of aquatic organisms*, 58(2-3), 143-150.
- León, M., & Bastías, R. (2015). Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 343.

- León, M., Kokkari, C., García, K., Castillo, D., Katharios, P., & Bastías, R. (2019). Diversification of *Vibrio anguillarum* Driven by the Bacteriophage CHOED. *Frontiers in microbiology*, *10*, 1396.
- Li, L., Meng, H., Gu, D., Li, Y., & Jia, M. (2019). Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis. *Microbiological Research*, *222*, 43-51.
- Lin, Z., Kumagai, K., Baba, K., Mekalanos, J. J., & Nishibuchi, M. (1993). *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene. *Journal of Bacteriology*, *175*(12), 3844-3855.
- Lipp, Erin K., Anwar Huq, and Rita R. Colwell. "Effects of global climate on infectious disease: the cholera model." *Clinical microbiology reviews* *15.4* (2002): 757-770.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L. & Yang, J. (2018). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*.
- Liu, R., Qiu, L., Yu, Z., Zi, J., Yue, F., Wang, L., ... & Song, L. (2013). Identification and characterisation of pathogenic *Vibrio splendidus* from Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) cultured in a low temperature environment. *Journal of invertebrate pathology*, *114*(2), 144-150.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., & Willems, A. (2008). Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *58*(1), 200-214.
- Mahoney, J. C., Gerding, M. J., Jones, S. H., & Whistler, C. A. (2010). Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence. *Applied and environmental microbiology*, *76*(22), 7459-7465.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, T., Uda, K., Tagomori, Y., Iijima, M., Najima, M., Nakano, A., Yamashita, Y., Kubota, S., Kimura, T., Yasunaga, T., Honda, H., Shinagawa, M., Hattori, T., and T. Iida. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet* *361*:743-749.

Matyar F, “Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast,” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol.89, no.3, pp. 551–556, 2012.

Melano, R., Petroni, A., Garutti, A., Saka, H. A., Mange, L., Pasterán, F., ... & Galas, M. (2002). New carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase (CARB-7) from *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains encoded by the VCR region of the *V. cholerae* genome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), 2162-2168.

Middelboe, M., Holmfeldt, K., Riemann, L., Nybroe, O., & Haaber, J. (2009). Bacteriophages drive strain diversification in a marine Flavobacterium: implications for phage resistance and physiological properties. *Environmental microbiology*, 11(8), 1971-1982.

Miller, J. R., Koren, S. & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, 95(6), 315–327.

Minagawa, M., & Wada, E. (1986). Nitrogen isotope ratios of red tide organisms in the East China Sea: a characterization of biological nitrogen fixation. *Marine chemistry*, 19(3), 245-259.

Mittal, S., & Davis, K. R. (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8(1), 165-171.

Miyoshi, S. I., Nakazawa, H., Kawata, K., Tomochika, K. I., Tobe, K., & Shinoda, S. (1998). Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family. *Infection and immunity*, 66(10), 4851-4855.

Miyoshi, S. I. (2006). *Vibrio vulnificus* infection and metalloprotease. *The Journal of dermatology*, 33(9), 589-595.

Nakhleh L, Jin G, Zhao F, Mellor-Crummey J. Reconstructing Phylogenetic Networks Using Maximum Parsimony. Proceedings of the 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference. 2005. pp. 93–102.

Nesper, J., Blaß, J., Fountoulakis, M., & Reidl, J. (1999). Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: immunity, exclusion, and integration. *Journal of bacteriology*, 181(9), 2902-2913

Ng, W. L., Perez, L. J., Wei, Y., Kraml, C., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2011). Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Molecular microbiology*, 79(6), 1407-1417.

Nguyen, B. M., Lee, J. H., Cuong, N. T., Choi, S. Y., Hien, N. T., Anh, D. D., ... & Kim, D. W. (2009). Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *Journal of clinical microbiology*, 47(5), 1568-1571.

Nishiguchi, M. K., & Nair, V. S. (2003). Evolution of symbiosis in the *Vibrionaceae*: a combined approach using molecules and physiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2019-2026.

Ohnishi, M., Kurokawa, K., & Hayashi, T. (2001). Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors?. *Trends in microbiology*, 9(10), 481-485.

Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., & Honda, T. (2005). Vibrios commonly possess two chromosomes. *Journal of bacteriology*, 187(2), 752-757.

Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of microbiology*, 43(spc1), 93-100.

Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(4), 415-425.

Oliver, J. D. & Jones, J. L. (2015). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *Molecular Medical Microbiology*, 1169–1186.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... Stevens, R. (2013). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D206–D214.

Oyanedel Trigo, D. A., Rojas, R., Brokordt, K., & Schmitt, P. *Crassostrea Gigas Oysters* from a Non-Intensive Farming Area Naturally Harbor Pathogenic *Vibrio* Strains. Available at SSRN 4053561.

Pacini, F. (1854). *Osservazioni microscopiche e deduzioni patologiche sul cholera asiatico*. Federigo Bencini.

- Panicker, G., & Bej, A. K. (2005). Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *vvhA*. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), 5702-5709.
- Paranjpye, R., Hamel, O. S., Stojanovski, A., & Liermann, M. (2012). Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific Northwest. *Applied and environmental microbiology*, 78(24), 8631-8638.
- Paris Mancilla, E. (2005). Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuad. méd.-soc.* (Santiago de Chile), 43-47.
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043-1055.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K. A., Bowers, J. C., Jones, J. L., Tamplin, M. L., McKay, R., ... & DePaola, A. (2008). Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters. *International journal of food microbiology*, 128(2), 354-361.
- Pérez-Cataluña, A., Lucena, T., Tarazona, E., Arahal, D. R., Macián, M. C., & Pujalte, M. J. (2016). An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic *Vibrio* spp. *Systematic and applied microbiology*, 39(6), 361-369.
- Pérez-Reytor, D., Plaza, N., Espejo, R. T., Navarrete, P., Bastías, R., & Garcia, K. (2017). Role of non-coding regulatory RNA in the virulence of human pathogenic *Vibrios*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2160.
- Prosseda, G., Fradiani, P. A., Di Lorenzo, M., Falconi, M., Micheli, G., Casalino, M., ... & Colonna, B. (1998). A role for H-NS in the regulation of the *virF* gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 149(1), 15-25.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ... & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1528-1533.
- Ranneby, B. (1984). The maximum spacing method. An estimation method related to the maximum likelihood method. *Scandinavian Journal of Statistics*, 93-112.

- Richards, J. C., Cox, A. D., Schweda, E. K., Martin, A., Hood, D. W., & Moxon, E. R. (2001). Structure and Functional Genomics of Lipopolysaccharide Expression in *Haemophilus influenzae*. In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates—2* (pp. 515-524). Springer, Boston, MA.
- Richter, M., & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(45), 19126-19131.
- Riemann, L., & Azam, F. (2002). Widespread N-acetyl-D-glucosamine uptake among pelagic marine bacteria and its ecological implications. *Applied and environmental microbiology*, *68*(11), 5554-5562.
- Rivera, I. G., Chowdhury, M. A., Huq, A., Jacobs, D., Martins, M. T., & Colwell, R. R. (1995). Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(8), 2898-2904.
- Robien, M. A., Krumm, B. E., Sandkvist, M., & Hol, W. G. (2003). Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. *Journal of molecular biology*, *333*(3), 657-674.
- Rojas, R., Miranda, C. D., Romero, J., Asenjo, F., Valderrama, K., Segovia, C., ... & Santander, J. (2015). Genome sequence of *Vibrio* VPAP30, isolated from an episode of massive mortality of reared larvae of the scallop *Argopecten purpuratus*. *Genome Announcements*, *3*(4), e00745-15.
- Rojas, R., Miranda, C. D., Santander, J., & Romero, J. (2016). First report of *Vibrio tubiashii* associated with a massive larval mortality event in a commercial hatchery of scallop *Argopecten purpuratus* in Chile. *Frontiers in microbiology*, *7*, 1473.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., & Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *98*(2), 652-657.
- Rowland, S. J., & Dyke, K. G. H. (1990). Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, *4*(6), 961-975.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., & Christen, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*,

Aeromonas, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 416-426.

Rzhetsky, A., & Nei, M. (1993). Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Molecular biology and evolution*, 10(5), 1073-1095.

Safa, A., Nair, G. B., & Kong, R. Y. (2010). Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in microbiology*, 18(1), 46-54.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.

Saranya, K., Sundaramanickam, A., Shekhar, S., Swaminathan, S., & Balasubramanian, T. (2017). Bioremediation of mercury by *Vibrio fluvialis* screened from industrial effluents. *BioMed Research International*, 2017.

Sawabe, T., Oda, Y., Shiomi, Y., & Ezura, Y. (1995). Alginate degradation by bacteria isolated from the gut of sea urchins and abalones. *Microbial Ecology*, 30(2), 193-202.

Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Feng, G., Amin, A. R., Mino, S., ... & Hayashi, T. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Frontiers in microbiology*, 4, 414.

Shah, S. Q., Cabello, F. C., L'Abée-Lund, T. M., Tomova, A., Godfrey, H. P., Buschmann, A. H., & Sørum, H. (2014). Antimicrobial resistance and antimicrobial resistance genes in marine bacteria from salmon aquaculture and non-aquaculture sites. *Environmental microbiology*, 16(5), 1310-1320.

Shapiro, O. H., Kushmaro, A., & Brenner, A. (2010). Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater. *The ISME journal*, 4(3), 327-336.

Sherr, E. (2000). Marine microbes: an overview. *Microbial ecology of the oceans*, 13-46.

Siboni, N., Balaraju, V., Carney, R., Labbate, M., & Seymour, J. R. (2016). Spatiotemporal dynamics of *Vibrio* spp. within the Sydney Harbour estuary. *Frontiers in microbiology*, 7, 460.

Sloup, R. E., Konal, A. E., Severin, G. B., Korir, M. L., Bagdasarian, M. M., Bagdasarian, M., & Waters, C. M. (2017). Cyclic di-GMP and VpsR induce the expression of type II secretion in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 199(19), e00106-17.

Snow, J. A. D. T. (1855). On the mode of communication of cholera 2nd edn. *John Churchill, New Burlington Street, London, England*.

Sinha, A., Pant, K. K., & Khare, S. K. (2012). Studies on mercury bioremediation by alginate immobilized mercury tolerant *Bacillus cereus* cells. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 1-8.

Silva-Rubio, A., Avendaño-Herrera, R., Jaureguiberry, B., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2008). First description of serotype O3 in *Vibrio anguillarum* strains isolated from salmonids in Chile. *Journal of fish diseases*, 31(3), 235.

Smith, A. B., & Siebeling, R. J. (2003). Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus*. *Infection and immunity*, 71(3), 1091-1097.

Sokal, R. R. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas, Sci. Bull.*, 38, 1409-1438.

Soni, R., Dash, B., Kumar, P., Mishra, U. N., & Goel, R. (2019). Microbes for bioremediation of heavy metals. In *Microbial Interventions in Agriculture and Environment* (pp. 129-141). Springer, Singapore.

Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 44(4), 846-849.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C., ... & Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 1043-1047.

Stingl, K., Schauer, K., Ecobichon, C., Labigne, A., Lenormand, P., Rousselle, J. C., ... & de Reuse, H. (2008). In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(12), 2429-2441.

Suginta, W., Vongsuwan, A., Songsiriritthigul, C., Prinz, H., Estibeiro, P., Duncan, R. R., ... & Fothergill-Gilmore, L. A. (2004). An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning,

expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 424(2), 171-180.

Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of *16S rRNA* genes by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 625-630.

Svitil, A. L., Chadhain, S. M. N. R., Moore, J. A., & Kirchman, D. L. (1997). Chitin degradation proteins produced by the marine bacterium *Vibrio harveyi* growing on different forms of chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), 408-413.

SUBPESCA, Gobierno de Chile (s.f). Salmón Atlántico. Recuperado el 07 de junio, 2022, de <https://www.subpesca.cl/portal/616/w3-article-863.html>.

Sudheesh, P. S., Jie, K., & Xu, H. S. (2002). Random amplified polymorphic DNA-PCR typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* isolated from cultured shrimps. *Aquaculture*, 207(1-2), 11-17.

Sun, S. (2001). *Cloning and characterization of lipooligosaccharide (LOS) biosynthetic genes of Haemophilus ducreyi*. The Ohio State University.

Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of *16S rRNA* genes by PCR. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 625-630.

Szabady, R. L., Yanta, J. H., Halladin, D. K., Schofield, M. J., & Welch, R. A. (2011). *TagA* is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins. *Microbiology*, 157(Pt 2), 516.

Tagomori, K., Iida, T., & Honda, T. (2002). Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4351-4358.

Takemura, A. F., Chien, D. M., & Polz, M. F. (2014). Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in microbiology*, 5, 38.

Thapar, N., & Sanderson, I. R. (2004). Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *The Lancet*, 363(9409), 641-653.

THI Huan, P., Whittle, B. L., Bastin, D. A., Lindberg, A. A., & Verma, N. K. (1997). Shigella flexneri type-specific antigen V: cloning, sequencing and characterization of the glucosyl transferase gene of temperate bacteriophage SfV. *Gene*, 195(2), 207-216

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Thompson, C. C., Thompson, F. L., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Dawyndt, P., & Swings, J. (2004). Use of *recA* as an alternative phylogenetic marker in the family *Vibrionaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 919-924.
- Thompson, F. L., Iida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(3), 403-431.
- Thompson, F. L., Gevers, D., Thompson, C. C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., ... & Swings, J. (2005). Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5107-5115.
- Thompson, F. L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A. T. R., & Sawabe, T. (2007). Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4279-4285.
- Tobe, T., Yoshikawa, M., Mizuno, T., & Sasakawa, C. (1993). Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by *virF* and repression by H-NS. *Journal of bacteriology*, 175(19), 6142-6149.
- Tracz, D. M., Backhouse, P. G., Olson, A. B., McCrea, J. K., Walsh, J. A., Ng, L. K., & Gilmour, M. W. (2007). Rapid detection of *Vibrio species* using liquid microsphere arrays and real-time PCR targeting the *ftsZ* locus. *Journal of medical microbiology*, 56(1), 56-65.
- Trosky, J. E., Mukherjee, S., Burdette, D. L., Roberts, M., McCarter, L., Siegel, R. M., & Orth, K. (2004). Inhibition of MAPK signaling pathways by *VopA* from *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 51953-51957.
- Turner, J. W., Good, B., Cole, D., & Lipp, E. K. (2009). Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *The ISME journal*, 3(9), 1082-1092.
- Turner, J. W., Tallman, J. J., Macias, A., Pinnell, L. J., Elledge, N. C., Nasr Azadani, D., ... & Strom, M. S. (2018). Comparative genomic analysis of *Vibrio diabolicus* and six taxonomic synonyms: a first look at the distribution and diversity of the expanded species. *Frontiers in microbiology*, 9, 1893.

Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., & Ohwada, K. (1997). 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family *Vibrionaceae*. *FEMS microbiology letters*, *152*(1), 125-132.

Uzzau, S., Cappuccinelli, P., & Fasano, A. (1999). Expression of *Vibrio cholerae* zonula occludens toxin and analysis of its subcellular localization. *Microbial pathogenesis*, *27*(6), 377-385.

Vaneechoutte, M., Rossau, R., De Vos, P., Gillis, M., Janssens, D., Paepe, N., ... & Kersters, K. (1992). Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*, *93*(3), 227-233.

Vaneechoutte, M., De Beenhouwer, H. A. N. S., Claeys, G., Verschraegen, G. E. R. D. A., De Rouck, A., Paepe, N. O. E. L. L. A., ... & Portaels, F. R. A. N. C. O. I. S. E. (1993). Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(8), 2061-2065.

Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de Vos, P. A. U. L., Claeys, G., & Verschraegen, G. (1995). Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(1), 11-15.

Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P. C., Colwell, R. R., Höfle, M. G., & Pruzzo, C. (2012). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME journal*, *6*(1), 21-30.

Vezzulli, L., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment. *Microbial ecology*, *65*(4), 817-825.

Vezzulli, L., Pezzati, E., Brettar, I., Höfle, M., & Pruzzo, C. (2015). Effects of global warming on *Vibrio* ecology. *Microbiology spectrum*, *3*(3), 3-3.

Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Hélaouët, P., Edwards, M., Höfle, M. G., ... & Pruzzo, C. (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(34), E5062-E5071.

Wagner-Döbler, I. (2003). Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. *Applied microbiology and biotechnology*, *62*(2), 124-133.

Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, *272*(5270), 1910-1914.

Warner, J. M., & Oliver, J. D. (1999). Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1141-1144.

Whitaker, W. B., Parent, M. A., Naughton, L. M., Richards, G. P., Blumerman, S. L., & Boyd, E. F. (2010). Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and environmental microbiology*, 76(14), 4720-4729.

Wong, H. C., & Lin, C. H. (2001). Evaluation of typing of *Vibrio parahaemolyticus* by three PCR methods using specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4233-4240.

Xie, Z. Y., Hu, C. Q., Chen, C., Zhang, L. P., & Ren, C. H. (2005). Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. *Letters in applied microbiology*, 41(2), 202-207.

Yáñez, R., Bastías, R., Higuera, G., Salgado, O., Katharios, P., Romero, J., Espejo, R. & García, K. (2015). Amplification of *tlh* gene in other Vibrionaceae specie by specie-specific multiplex PCR of *Vibrio parahaemolyticus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 459-463.

Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D. L., Wang, Q. Y., & Zhang, Y. X. (2008). Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system. *Journal of fish diseases*, 31(3), 161-169.

Yévenes, M., Quiroz, M., Maruyama, F., Jorquera, M., & Gajardo, G. (2021). *Vibrio* sp. ArtGut-C1, a polyhydroxybutyrate producer isolated from the gut of the aquaculture live diet *Artemia* (Crustacea). *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, 22-28.

Yoon, S. H., Ha, S. M., Lim, J., Kwon, S., & Chun, J. (2017). A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 110(10), 1281-1286.

Yu, Y., Yang, H., Li, J., Zhang, P., Wu, B., Zhu, B., ... & Fang, W. (2012). Putative type VI secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* contribute to adhesion to cultured cell monolayers. *Archives of microbiology*, 194(10), 827-835.

Yuan, Y., Feng, Z., & Wang, J. (2020). *Vibrio vulnificus* hemolysin: biological activity, regulation of *vvhA* expression, and role in pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, 11, 599439.

Zheng, J., Ho, B., & Mekalanos, J. J. (2011). Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *PloS one*, 6(8), e23876.

Zheng, X. Y., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P. P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., He, S. Y., & Dong, X. (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe*, 11(6), 587–596.

8. ANEXOS

Tabla S1. Sitio y frecuencia de corte de las endonucleasas utilizadas para ARDRA

Endonucleasa	Sitio de corte	λ	Ad-2	Φ X174	pUC18	M13mp18	pBR322
<i>HhaI</i>	5' ...GCG C... 3' 3' ...C GCG... 5'	215	375	18	17	26	31
<i>Hinf</i>	5' ...G ANTC... 3' 3' ...CTNA G... 5'	148	72	21	6	27	10
<i>MspI</i>	5' ...C CGG... 3' 3' ...GGC C... 5'	328	171	5	13	18	26

Tabla S2. Estadísticas de los ensamblados *de novo* y la referencia M3AB11.

Ensamble	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	6.077.498	4.080.840
Lecturas sin usar	15.432	8.105.020
Contigs totales	63	1.276
Contigs > 1.000 pb	49	680
Contigs > 10.000 pb	35	6
Contigs > 100.000 pb	13	0
Contig más largo (pb)	546.602	16.734
Tamaño contig promedio (pb)	16.043	1.496
Cobertura promedio (lectura/posición)	121,38	189,12
Tamaño total (pb)	5.007.073	2.157.725
Contenido GC (%)	43,84	45,93
N50	336.188	2.410
N75	141.798	1.225
L50	6	252
L75	12	571
Mismatches / 100 kb	51,91	197,29
Genes predichos	3398	1935
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	99,9	77,3
Contaminación (%)	4,7	2,1

Tabla S3. Estadísticas de los ensamblados *de novo* y la referencia M3AB5.

Ensamble	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	6.046.286	5.811.184
Lecturas sin usar	13.574	6.308.536
Contigs totales	60	1.260
Contigs > 1.000 pb	47	4

Contigs > 10.000 pb	32	0
Contigs > 100.000 pb	13	0
Contig más largo (pb)	588.008	16.735
Tamaño contig promedio (pb)	18,278	1.533
Cobertura promedio (lecturas/posición)	120,72	267,41
Tamaño total (pb)	5.008.456	2.173.092
Contenido GC (%)	43,84	45,93
N50	336.203	2.476
N75	159.883	1.263
L50	6	247
L75	11	560
Mismatches / 100 kb	34,62	189,87
Genes predichos	3.392	1.938
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	99,9	78,9
Contaminación (%)	4,7	1,5

Tabla S4. Estadísticas ensamblados *de novo* y la referencia M1AB29.

Ensamble M1AB29	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	7.211.804	13.233.983
Lecturas sin usar	1.918	1.193.461
Contigs totales	42	49
Contigs > 1.000 pb	27	41
Contigs > 10.000 pb	22	25
Contigs > 100.000 pb	11	11
Contig más largo (pb)	892.212	1.379.233
Tamaño contig promedio (pb)	18.218	73.325
Cobertura promedio (lecturas/posición)	137,1	265,7
Tamaño total (pb)	5.259.287	4.980.847
Contenido GC (%)	44,5	44,8
N50	579278	683.578
N75	346845	138.464
L50	4	3
L75	7	8
Mismatches / 100 kb	23,71	13,65
Genes predichos	3.693	3.478
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	100	100
Contaminación (%)	0,75	0,17

Tabla S5. Estadísticas ensambles *de novo* y la referencia P1B4.

Ensamble P1B4	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	7.535.928	13.024.052
Lecturas sin usar	2.989	2.063.782
Contigs totales	79	165
Contigs > 1.000 pb	59	146
Contigs > 10.000 pb	39	93
Contigs > 100.000 pb	15	13
Contig más largo (pb)	800.919	339.212
Tamaño contig promedio (pb)	13.397	8.153
Cobertura promedio (lecturas/posición)	121,8	237,0
Tamaño total (pb)	6.189.057	5.494.776
Contenido GC (%)	45,02	45,39
N50	397.028	77.926
N75	124.135	40.234
L50	6	20
L75	14	43
Mismatches / 100 kb	57,2	45,06
Genes predichos	4.384	3.989
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	99,74	99,74
Contaminación (%)	0,64	0,11

Tabla S6. Estadísticas ensambles *de novo* y la referencia M1AB15.

Ensamble	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	7.222.966	13.276.558
Lecturas sin usar	1.385	1.237.812
Contigs totales	33	79
Contigs > 1.000 pb	26	65
Contigs > 10.000 pb	21	45
Contigs > 100.000 pb	19	23
Contig más largo (pb)	1.194.498	385.644
Tamaño contig promedio (pb)	22.873	9.438
Cobertura promedio (lecturas/posición)	140,0	274,2
Tamaño total (pb)	5.160.230	4.841.219
Contenido GC (%)	44,88	45,16
N50	856.268	145.357
N75	228.951	108.241
L50	3	11
L75	6	20

Mismatches / 100 kb	11,63	24,31
Genes predichos	3.699	3.469
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	100	99,74
Contaminación (%)	0,45	0,0

Tabla S7. Estadísticas ensambles *de novo* y la referencia M3AB8.

Ensamble M3AB8	<i>de novo</i>	la referencia
Lecturas ensambladas	6.010.739	11.318.575
Lecturas sin usar	32.346	767.595
Contigs totales	33	66
Contigs > 1.000 pb	24	55
Contigs > 10.000 pb	16	42
Contigs > 100.000 pb	10	17
Contig más largo (pb)	940.480	482.087
Tamaño contig promedio (pb)	15.535	58.119
Cobertura promedio (lecturas/posición)	121,8	237,7
Tamaño total (pb)	4.933.163	4.761.389
Contenido GC (%)	43,57	43,85
N50	774.050	161.742
N75	286.092	87.939
L50	3	10
L75	6	21
Nº mismatches / 100 kb	25,93	27,47
Genes predichos	3.254	1.308
Marcadores	1.067	1.067
Integridad (%)	99,87	99,87
Contaminación (%)	0,94	0,79

Tabla S8. Lista acceso genomas referenciales utilizados en MLSA.

Cepa	Número acceso secuencia referencial NCBI	Fecha ensamble
<i>V. aerogenes</i> CECT 7868	NZ_FQXZ01000077	12-12-2016
<i>V. aestuarianus</i> subsp. <i>cardii</i> I2/I22 3T	NZ_JAAKZN010000100	09-03-2020
<i>V. alginolyticus</i> FDAARGOS_97	NZ_LOSN02000001	19-01-2018
<i>V. anguillarum</i> PF4-E2-R4	NZ_CP031494	15-08-2018
<i>V. antiquarius</i> EX25	NC_013456	03-11-2009
<i>V. aquaticus</i> BEI207	NZ_RXZH01000001	24-12-2018
<i>V. astriarenae</i> HN897	NZ_CP047475	14-02-2020
<i>V. atlanticus</i> LGP32	NC_011753	13-02-2009

<i>V. atypicus</i> DSM 25292	NZ_BLID01000001	06-12-2019
<i>V. azureus</i> LC2-005	NZ_CP018616	03-01-2018
<i>V. barjaei</i> 3062	NZ_LQXO02000001	07-11-2016
<i>V. bivalvicida</i> 605	NZ_LLEI02000006	17-05-2016
<i>V. brasiliensis</i> LMG 20546	NZ_AEVS01000116	11-02-2011
<i>V. breoganii</i> 10N.222.51.E4	NZ_MDBB01000001	11-01-2018
<i>V. campbelli</i> BoB-53	NZ_CP026321	30-01-2018
<i>V. caribbeanicus</i> ATCC BAA-2122	NZ_AEIU01000126.1	20-10-2010
<i>V. casei</i> JB196	NZ_QPGL01000001	22-07-2018
<i>V. celticus</i> Rd 8.15	NZ_MVJF01000010	22-05-2017
<i>V. chagasii</i> LMG 21353	NZ_SZQG01000001	13-05-2019
<i>V. cholerae</i> RFB16	NZ_CP043554	11-09-2019
<i>V. cincinnatiensis</i> NCTC12012	NZ_UHIE01000003	01-08-2018
<i>V. comitans</i> NBRC 102076	NZ_BJLH01000001	16-06-2019
<i>V. corallilyticus</i> S2052	NZ_CP063051	29-10-2020
<i>V. crassostreae</i> 16SF1-51	NZ_RJKJ01000001	15-11-2018
<i>V. cyclitrophicus</i> ECSMB14105	NZ_CP039700	05-05-2019
<i>V. diabolicus</i> FDAARGOS_105	NZ_CP014036.1	20-02-2018
<i>V. diazotrophicus</i> 65.7M	NZ_POSL01000001	19-01-2018
<i>V. europaeus</i> PP-638	NZ_LUAX01000001	07-09-2016
<i>V. ezurae</i> JCM 21522	NZ_BCUQ01000001	23-08-2018
<i>V. fluviales</i> ATCC 33809	NZ_CP014034	29-01-2018
<i>V. fortis</i> Dalian14	NZ_JFFR01000001	23-04-2014
<i>V. furnissii</i> FDAARGOS_77	NZ_CP040990	19-06-2019
<i>V. gallaecicus</i> DSM 23502	NZ_SZXU01000001	13-05-2019
<i>V. gazogenes</i> ATCC 43942	NZ_CP018835	15-06-2017
<i>V. gigantis</i> LGP 13	NZ_MVJE01000001	22-05-2017
<i>V. haliotocoli</i> IAM 14596	NZ_BCUP01000001	23-08-2018
<i>V. harveyi</i> ATCC 33843	NZ_CP009467	05-12-2014
<i>V. hepatarius</i> DSM 19134	NZ_LHPI01000001.	26-08-2015
<i>V. ichthyenteri</i> ATCC 700023	NZ_AFWF01000326	04-08-2011
<i>V. inusitatus</i> NBRC 102082	NZ_BJLF01000001	16-06-2019
<i>V. jasicida</i> 090810c	NZ_CP025792	17-01-2018
<i>V. kanaloe</i> R17	NZ_CP065150	01-12-2020
<i>V. litoralis</i> DSM 17657	NZ_KE384566	11-07-2013
<i>V. mangrovi</i> CECT 7927	NZ_FXXI01000030	26-05-2017
<i>V. mediterranei</i> Vic-OC-097	NZ_JABXGK010000001	22-06-2020
<i>V. metschnikovii</i> 9502-00	NZ_CP046793	18-12-2019
<i>V. mimicus</i> MB-451	NZ_ADAF01000003	23-10-2009
<i>V. mytilii</i> CAIM 528	NZ_JXOK01000001	30-01-2015

<i>V. natriegens</i> ATCC 14048	NZ_CP009977	03-12-2015
<i>V. navarrensis</i> 0053-83	NZ_CP051121	13-04-2020
<i>V. nereis</i> NBRC 15637	NZ_BCUD01000001	23-02-2016
<i>V. nigripulchritudo</i> POn4	NZ_CAOA01000001	02-10-2013
<i>V. orientalis</i> CIP 102891	NZ_ACZV01000005	09-10-2009
<i>V. ostreicida</i> UCD-KL-16	NZ_MPHM01000001	19-01-2017
<i>V. owensii</i> XSBZ03	NZ_CP019959	06-03-2017
<i>V. pacinii</i> DSM 19139	NZ_JONH01000001	25-06-2014
<i>V. parahaemolyticus</i> O3:K6 RIMD 2210633	NC_004603	11-05-2004
<i>V. penaeicida</i> IFO 15640	NZ_AP025144.1	09-09-2021
<i>V. plantisponsor</i> LMG 24470	NZ_JABEQC010000001	11-05-2020
<i>V. proteolyticus</i> NBRC 13287	NZ_BATJ01000050	13-09-2013
<i>V. rhizosphaerae</i> DSM 18581	NZ_KL543967	25-06-2014
<i>V. rotiferianus</i> B64D1	NZ_CP018311	05-07-2017
<i>V. ruber</i> CECT 7878	NZ_FULE01000097	11-02-2017
<i>V. rumoiensis</i> FERM P-14531	NZ_AP018685	06-06-2018
<i>V. scophthalmi</i> FP3289	NZ_MDCJ01000001	12-09-2016
<i>V. splendidus</i> 10N.286.52.F10	NZ_MCTR01000001	11-01-2018
<i>V. tasmaniensis</i> LMG 20012	NZ_VARQ01000001	12-06-2019
<i>V. tubiashii</i> ATCC 19109	NZ_CP009354	05-11-2014
<i>V. vulnificus</i> FORC_037	NZ_CP016321	22-06-2017

Tabla S9. Detalles de la anotación de los factores de virulencia aislado del aislado M3AB11.

Factor de virulencia	Factor de virulencia	Genes determinados (ORF)
Adherencia	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pili MSHA tipo IV)	<i>mshA/B/E/G/H/I/J/K/L/M/N</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB/C/D</i>
	Fibras Curli	<i>csgG</i>
	Pili Flp tipo IV (<i>Aeromonas</i>)	<i>flpF</i>
	Biosíntesis LPS antígeno-O (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>n/d</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>wbfV, wecA, n/d, uge</i>
Quimiotaxis y motilidad	Flagelo	<i>cheA/B/R/V/W/Y/Z, flhM, flhA/B/C/D/E/G/I, flgA-N, flhA/B/F/G, fliA/D-S, flrA-C, motA/B/X/Y</i>
Enzimas	Metaloproteinasa	<i>hap/vvp</i>
Metabolismo de hierro	Hemo receptores	<i>HutA</i>
Quorum Sensing	Autoinductor-2	<i>LuxS</i>

	Autoinducto-1 (<i>Cholerae</i>)	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Sistema de secreción EPS tipo II	<i>epsC/E/F/G/H/I/J/K/L/M/N, gspD</i>
	Proteínas efectoras VAS	<i>hcp2, vgrG-2/3</i>
	VAS SST4	<i>vasA-H/K</i>
Toxinas	Hemolisina/ Citolisina	<i>whA</i>
	Hemolisina termolábil	<i>Tlh</i>
Endotoxinas	LOS (<i>Haemophilus</i>)	<i>igtF</i>
Evasión inmune	capsula (<i>Actinobacter</i>)	<i>n/d</i>
	LOS (<i>Campylobacter</i>)	<i>n/d</i>
	LPS (<i>Brucella</i>)	<i>acpXL</i>
Otros	Antígeno-O (<i>Yersinia</i>)	<i>cpsB</i>

Tabla S10. Detalles de la anotación de los genes de resistencia a antimicrobianos del aislado M3AB11.

Gen	Familia AMR	Fenotipo	Criterio de detección	Identidad (%)	% largo de la secuencia de referencia
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, Tetraciclina	homología de proteínas	42,2	99,2
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, Fluoroquinolonas, Penicilina	homología de proteínas	94,8	100,0
<i>qacJ</i>	Bomba de salida para SMR	Agentes desinfectantes y antisépticos	homología de proteínas	48,1	101,9

Tabla S11. Detalles de la anotación de los factores de virulencia del aislado M3AB5.

Tipo de VF	Factor de Virulencia	Genes determinados (ORF)
Adherencia	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pili MSHA tipo IV)	<i>mshA/B/E/G/H/I/J/K/L/M/N</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB/C/D</i>
	Fibras Curli	<i>csgG</i>
	Pili Flp tipo IV (<i>Aeromonas</i>)	<i>flpF</i>
	Biosíntesis LPS antígeno-O (<i>P. aeruginosa</i>)	<i>n/d</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>wbfV</i> <i>wecA</i> <i>n/d</i>

		<i>uge</i>
Quimiotaxis y motilidad	Flagelo	<i>cheA/B/W/Y/Z, flhA/F/G, fliA</i> <i>cheR/V, flaA/C,</i> <i>flgA-L, flgM/N</i> <i>filM, flaB/D/E/G/I, flhB, fliD-K/L-S, flrA-C, motA/B</i> <i>motX</i> <i>motY</i>
Enzimas	Metaloproteinasa	<i>hap/vvp</i>
Metabolismo de hierro	Hemo receptores	<i>hutA</i>
<i>Quorum-Sensing</i>	Autoinductor-2	<i>luxS</i>
	Autoinducto-1 (<i>Cholerae</i>)	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Sistema de secreción EPS tipo II	<i>epsC/E/F/G/H/I/J/K/L/M/N, gspD</i>
	Proteínas efectoras VAS	<i>hcp-2, vgrG-3</i> <i>vgrG-2</i>
	VAS SST4	<i>vasA-H/K</i>
Toxinas	Hemolisina/ Citolisina	<i>whA</i>
	Hemolisina termolabil	<i>tlh</i>
Endotoxinas	LOS (<i>Haemophilus</i>)	<i>igtF</i>
Evasión inmune	capsula (<i>Actinobacter</i>)	<i>n/d</i>
	LOS (<i>Campylobacter</i>)	<i>n/d</i>
	LPS (<i>Brucella</i>)	<i>acpXL</i>
Otros	Antígeno-O (<i>Yersinia</i>)	<i>cpsB</i>

Tabla S12. Detalles de la anotación de los genes de resistencia a antimicrobianos aislado del M3AB5.

Gen	Familia AMR	Resistencia a	Mecanismo de resistencia	de	Identidad (%)	% largo de la secuencia de referencia
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, fluoroquinolonas, penicilina	Salida de antibiótico	de	94,8	100,0
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, tetraciclina	Salida de antibiótico	de	42,2	99,2
<i>qacJ</i>	Bomba de salida para SMR	Agentes desinfectantes y antisépticos	Salida de antibiótico	de	48,1	101,9

Tabla S13. Detalles de la anotación de los factores de virulencia del aislado M1AB29.

Tipo de VF	Factor de Virulencia	Genes relacionados
Adherencia	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pili MSHA tipo IV)	<i>mshA-N</i>
	Pili tipo IV	<i>pilA-D</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>cpsA-J, wbfV, wecA, wza/b/c</i>
Quimiotaxis y motilidad	Flagelo	<i>cheA/B/R/V/W/Y/Z, flhM, flhA/B/D/E/G/I, flgA-N, flhA/B/F/G, flhA/D-S, flrA-C, motA/B/X/Y</i>
Metabolismo de hierro	Receptores de enterobactina	<i>irgA, vctA</i>
	Heme receptores	<i>hutA/R</i>
	Proteínas de unión periplasmáticas dependiente de transportadores ABC	<i>vctC/D/G/P</i>
<i>Quorum-Sensing</i>	Autoinductor-2	<i>luxS</i>
	Autoinductor-1 Cholerae	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Sistema Secreción EPS Tipo II	<i>epsC/E-N, gspD</i>
	Efectores secretados T3SS1	<i>vopQ/R/S</i>
	T3SS1	<i>sycN, tyeA, vcrD/G/H/R/V, virF/G, vopB/D/N, vscA-Y</i>
	T3SS2	<i>verD2, vscC2, vscN2</i>
	Efectores T4SS (<i>Coxiella</i>)	<i>n/d</i>
Toxinas	Hemolisina termolábil	<i>tth</i>
	Fitotoxina coronatina (<i>Pseudomonas</i>)	<i>n/d</i>
Formación biofilm	Transportador autoinducido de <i>adeFGH</i> (<i>Actinobacter</i>)/ eflujo	<i>adeG</i>
Evasión inmune	Capsula (<i>Actinobacter</i>)	<i>n/d</i>

Tabla S14. Detalles de la anotación de los genes de resistencia a antimicrobianos del aislado M1AB29.

Gen	Familia AMR	Resistencia a	Mecanismo de resistencia	Identidad (%)	% largo de la secuencia de referencia
<i>CARB-42</i>	CARB beta-lactamasa	Penicilina	Inactivación del antibiótico	100,0	100,0
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, tetraciclina	Salida de antibiótico	61,1	98,8
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, fluoroquinolonas, penicilina	Salida de antibiótico	95,2	100,0
<i>qacG</i>	Bomba eflujo de antibiótico SMR	Desinfectantes y antisépticos	Salida de antibiótico	34,9	110,3

<i>parE</i> (<i>E. coli</i>) D476N	<i>parE</i> resistente a fluoroquinolonas	Antibiótico fluoroquinolona	Alteración blanco antibiótico	78,7	99,4
--------------------------------------	---	-----------------------------	-------------------------------	------	------

Tabla S15. Detalles de la anotación de los factores de virulencia del aislado P1B4.

Tipo de VF	Factor de Virulencia	Genes relacionados
Adherencia	Factor colonización accesorio	<i>acfD</i>
	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pilus MSHA tipo IV)	<i>msh A/B/C/D/E/F/G/H/I/J/K /L/M/N</i>
	Pilus tipo IV	<i>pilB/C/D</i>
	Locus tad (<i>Haemophilus</i>)	<i>tadA</i>
	Pili tipo IV (<i>Yersinia</i>)	<i>pilW</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>cpsA/B/C/D/E/F/G/H/I/J</i> , <i>hpl</i> , <i>wbfV/Y</i> , <i>wbjD</i> , <i>wecA/C</i> , <i>wza/b/c</i>
Quimiotaxis y motilidad	Flagelo	<i>cheA/B/R/V/W/Y/Z</i> , <i>filM</i> , <i>flA/B/D/E/G/I</i> , <i>flgA-N</i> , <i>flhA/B/F/G</i> , <i>fliA/D-S</i> , <i>flrA-C</i> , <i>motA/B/X/Y</i>
Enzimas	Enolasa estreptococcal	<i>eno</i>
Metabolismo de hierro	Receptores de enterobactina	<i>vctA</i>
	Heme receptores	<i>hutA/R</i>
	Proteínas de unión periplasmáticas dependiente de transportadores ABC	<i>vctC/D/G/P</i>
	Vibriobactina	<i>vibE</i>
	Transportador hierro ferroso (<i>Shigella</i>)	<i>sitC</i>
	Transportador Fe/Mn (<i>Escherichia</i>)	<i>sitA/B/D</i>
Quorum Sensing	Autoinductor-2	<i>luxS</i>
	Autoinductor-1 Cholerae	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Tipo II EPS	<i>epsC/E-N</i> , <i>gspD</i>
	Efectores T3SS1	<i>vopQ/R/S</i>
	T3SS1	<i>sycN</i> , <i>tyeA</i> , <i>vcrD/G/H/R/V</i> , <i>virF</i> , <i>vopB/D/N</i> , <i>vscA/C-Y</i> , <i>vxsC</i>
	Proteínas efectoras VAS	<i>vgrG-3</i>
	Sistema secreción VAS tipo VI	<i>vasG</i>
Toxinas	Hemolisina termolábil	<i>Tlh</i>
	Aerolisina AerA/Enterotoxina citotóxica Act (<i>Aeromonas</i>)	<i>aerA/act</i>
Resistencia a ácido	Ureasa (<i>Helicobacter</i>)	<i>ureB/G</i>
Endotoxinas	LOS (<i>Haemophilus</i>)	<i>igtF</i>
Componentes superficie celular	Transportador ABC de trehalasa-recíclica	<i>sugC</i>

Tabla S16. Detalles de la anotación de los genes resistencia a antimicrobianos del aislado PIB4.

Gen	Familia AMR	Resistencia a	Mecanismo de resistencia	Identidad (%)	% largo de la secuencia de referencia
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, tetraciclina	Salida de antibiótico	42,97	99,15
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, fluoroquinolonas, penam	Salida de antibiótico	95,24	100,0
<i>parE</i> (E. coli) D476N	<i>parE</i> resistente a fluoroquinolonas	Antibiótico fluoroquinolona	Alteración blanco antibiótico	78,98	99,37

Tabla S17. Detalles de la anotación de los factores de virulencia del aislado M1AB15.

Tipo de VF	Factor de Virulencia	Genes relacionados
Adherencia	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pili MSHA tipo IV)	<i>msh A/B/C/D/E/F/G/H/I/J/K /L/M/N</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB/C/D</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>cpsA/B/C/D/E/F/G/H/I/J, wbfV, wecA, wza/b/c</i>
Quimiotaxis y motilidad	Flagelo	<i>cheA/B/R/V/W/Y/Z, flm, flA/B/D/E/G/I, flgA-N, flhA/B/F/G, flhA/D-S, flrA-C, motA/B/X/Y</i>
Metabolismo de hierro	Receptores de enterobactina	<i>irgA, vctA</i>
	Heme receptores	<i>hutA/R</i>
	Proteínas de unión periplasmáticas dependiente de transportadores ABC	<i>vctC/D/G/P</i>
Quorum Sensing	Autoinductor-2	<i>luxS</i>
	Autoinductor-1 Cholerae	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Sistema secreción EPS tipo II	<i>epsC/E-N, gspD</i>
	Efectores T3SS1	<i>vopQ/R/S, n/d</i>
	T3SS1	<i>sycN, tyeA, vcrD/G/H/R/V, virF, vopB/D/N, vscA-Y, vxsC</i>
	Efectores T4SS (<i>Coxiella</i>)	<i>n/d</i>
Toxinas	Hemolisina termolábil	<i>Tlh</i>
	Fitotoxina corotanina (<i>Pseudomonas</i>)	<i>n/d</i>
Evasión inmune	Cápsula (<i>Actinobacter</i>)	<i>n/d</i>
	LOS (<i>Campylobacter</i>)	<i>n/d</i>

Tabla S18. Detalles de la anotación de los genes resistencia a antimicrobianos del aislado M1AB15.

Gen	Familia AMR	Resistencia a	Mecanismo de resistencia	Identidad (%)	Porcentaje largo de la secuencia de referencia
<i>qacG</i>	Bomba de salida para SMR	Agentes desinfectantes y antisépticos	Salida de antibiótico	36,89	110,28
<i>TxR</i>	Bomba de salida ABC	Tetraciclina	Salida de antibiótico	86,29	99,69
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, Tetraciclina	Salida de antibiótico	43,25	99,15
<i>CARB-42</i>	CARB beta-lactamasa	Penam	Inactivación del antibiótico	96,34	96,47
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, Tetraciclina	Salida de antibiótico	43,83	98,77
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, fluoroquinolonas, penam	Salida de antibiótico	95,24	100,00
<i>parE</i> (<i>E. coli</i>) D476N	parE resistente a fluoroquinolonas	Antibiótico fluoroquinolona	Alteración blanco antibiótico	78,5	99,37

Tabla S19. Detalles de la anotación de los factores de virulencia del aislado M3AB8.

Tipo de VF	Factor de Virulencia	Genes relacionados
Adherencia	Hemaglutinina Manosa-Sensitiva (pili MSHA tipo IV)	<i>mshA/B/D/E/G-N</i>
	Pili tipo IV	<i>pilB-D</i>
	Pili Flp tipo IV	<i>flpF</i>
	hsp60	<i>htpB</i>
	Fragelo polar (<i>Aeromonas</i>)	<i>flmH</i>
	Fragelo polar (<i>Aeromonas</i>)	<i>nueA</i>
	Pili Tap tipo IV (<i>Aeromonas</i>)	<i>tapQ/T/U</i>
Antifagocitosis	Polisacárido capsular	<i>wbfB/T/U/V/Y, wza/b/c</i>
	Regulación alginato (<i>Pseudomonas</i>)	<i>algU</i>
	Cápsula (<i>Klebsiella</i>)	<i>gnd</i>
	Cápsula (<i>Klebsiella</i>)	<i>uge</i>
Quimiotaxis y motilidad	Fragelo	<i>cheA/B/R/V/W/Y/Z, flmM, flA-E/G, flgA-N, flhA/B/F/G, fliA/D-S, flrA-C, motA/B/X/Y</i>
Enzimas	Metaloproteinasa	<i>Hap</i>
	Enolasa (<i>Streptococcus</i>)	<i>eno</i>
Metabolismo de hierro	Heme receptores	<i>hutA/R</i>

	Proteínas de unión periplasmáticas dependiente de transportadores ABC	<i>vctC/D/G</i>
	Maduración citocromo C	<i>ccmF</i>
	Transporte hierro (<i>Haemophilus</i>)	<i>hitA/B/C</i>
	Hemo biosíntesis (<i>Haemophilus</i>)	<i>hemA/B/C/E/G/L/N</i>
<i>Quorum-Sensing</i>	Autoinductor-2	<i>luxS</i>
	Autoinductor-1 Cholerae	<i>cqsA</i>
Sistemas de secreción	Tipo II EPS	<i>epsC/E-N, gspD</i>
	Sistema secreción VAS tipo VI	<i>vasG</i>
	Efectores TTSS Mixi-Spa (<i>Shigella</i>)	<i>ipaH</i>
	Efectores T4SS (<i>Coxiella</i>)	<i>n/d</i>
	T6SS-II	<i>n/d</i>
Toxinas	Hemolisina termolábil	<i>tlh</i>
	Hemolisina III	<i>n/d</i>
	Fitotoxina faseolotoxina	<i>cysCI</i>
Resistencia a ácido	Ureasa (<i>Helicobacter</i>)	<i>ureB/G</i>
Formación biopelícula	Transportador autoinducido de <i>adeF GH</i> (<i>Actinobacter</i>)/ eflujo	<i>adeG</i>
Adherencia e Invasión	EF-Tu (<i>Francisella</i>)	<i>n/d</i>
Metabolismo de aminoácidos y purinas	síntesis glutuamina (<i>Mycobacterium</i>)	<i>glnAI</i>
Componentes superficie celular	Transportador ABC treholasa-reciclica	<i>sugC</i>
Colonización y evasión inmune	Biosíntesis y transporte capsula	<i>kpsF</i>
Bomba de eflujo	AcrAB (<i>Klebsiella</i>)	<i>n/d</i>
Endotoxinas	LOS (<i>Haemophilus</i>)	<i>gmhA/lpcA, kdkA, lpxA-D, msbA, opsX/rfaC, orfM, rfaD/E</i>
Evasión sist. inmune	Capsula (<i>Actinobacter</i>)	<i>n/d</i>
	Exopolisacarido (<i>Haemophilus</i>)	<i>galE, mrsA, pgi</i>
	LPS (<i>Brucella</i>)	<i>acpXL</i>
Metabolismo de lípidos	Síntesis Pantotenato	<i>panC</i>
Factor nutricional	Metabolismo Alantoína	<i>n/d</i>
Virulencia	biosíntesis pirimidina	<i>n/d</i>
Regulación	Sistema de dos componentes (<i>Actinobacter</i>)	<i>bfmR</i>
	Factor sigma alternativo RpoS	<i>rpoS</i>
	Regulador A Almacenamiento Carbono	<i>csrA</i>

	GacS/GacA Sistema dos componentes	<i>gacA</i>
Captura fagosoma	Quinasa nucleosidica difosfata	<i>ndk</i>
Otros	Antígeno-O (<i>Yersinia</i>)	<i>cpsB, gmd, wcaG</i>
Adaptación al estres	Catalasa (<i>Neisseria</i>)	<i>kata</i>

Tabla S20. Detalles de la anotación de los genes resistencia a antimicrobianos del aislado M3AB8.

Gen	Familia AMR	Resistencia a	Mecanismo de resistencia	Identidad (%)	% largo de la secuencia de referencia
<i>QnrS2</i>	Resistencia a quinolona (qnr)	Fluoroquinolona	Protección sitio blanco	85,78	100,00
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, Tetraciclina	Salida de antibiótico	61,43	98,39
<i>CRP</i>	Bomba de eflujo para RND	Macrólidos, fluoroquinolonas, penicilina	Salida de antibiótico	94,76	100,00
<i>adeF</i>	Bomba de eflujo para RND	Fluoroquinolonas, tetraciclina	Salida de antibiótico	41,83	99,15